



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사학위논문

Simvastatin에 의한 Actin Integrity 변화에 따른
혈관 평활근 세포사멸 및 수축 기능 손상

Simvastatin Induces Apoptosis and Contractile Dysfunction
through the Disruption of Actin Integrity
in Vascular Smooth Muscle Cells

2016 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 예방약학전공
강 서 진

국 문 초 록

스타틴은 고콜레스테롤혈증 (hypercholesterolemia) 치료제로 널리 사용되는 약물로서, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) pathway를 차단함으로써 콜레스테롤 생합성을 억제한다. 이 과정에서 콜레스테롤뿐만 아니라 HMG-CoA로부터 생성되는 geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), farnesyl pyrophosphate (FPP)와 같은 isoprene 역시 합성이 감소되는 것으로 알려져 있다. Isoprene은 RhoA, Rac-1과 같은 small GTPase protein을 활성화시키고, 활성화된 small GTPase protein은 cytoskeleton의 조절, 수축, 증식, 생존 등 세포 내 다양한 생리적 작용을 조절한다. 실제로 골격근에서 스타틴에 의한 isoprene 감소 및 small GTPase protein의 활성 저하에 의해 근육 수축력의 감소 및 세포의 apoptosis가 나타나는 현상이 약물의 부작용으로 보고되어 있는데, 명확한 기전은 현재까지 밝혀지지 않았다. 혈관 평활근은 골격근과 해부적, 기능적 유사성을 나타내는 근육 조직으로, 역시 스타틴에 의한 수축 기능의 저하와 apoptosis가 보고되어 있다. 최근 심바스타틴에 의해 혈관 평활근의 수축 억제 현상이 비가역적인 기능의 손상이며 apoptosis 및 vascular remodeling을 초래하는 독성 현상임이 발표되었다. 이 역시 small GTPase RhoA의 기능 저하에 기인하는 현상이라고 사료되나, RhoA의 활성 감소로부터 어떻게 수축 기능 저하와 apoptosis가 동시에 유발되는지에 대한 자세한 기전은 연구되지 않았다.

본 연구에서는 small GTPase protein의 대표적인 downstream이자, 근육에서 수축과 세포 생존 및 사멸을 관장하는 공통적인 인자로서의 actin cytoskeleton에 주목하였다. Actin cytoskeleton은 RhoA/ROCK

pathway에 의해 합성되어 myosin과의 작용을 통해 수축을 일으키는 데 핵심적인 구조이다. 또한 Bmf와 같은 pro-apoptosis 작용을 가지는 인자를 sequestering하고 있어 세포의 apoptosis 여부를 결정하는 것이 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 심바스타틴에 의해 혈관 평활근의 actin cytoskeleton의 손상에 따라 apoptosis가 유발되는 과정을 규명하고자 하였다. 초대 배양한 혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의한 RhoA 및 Rac-1의 활성 저하와 actin cytoskeleton이 현저하게 감소하는 것이 확인되었다. Actin cytoskeleton의 감소에 따라 pro-apoptotic Bmf가 actin cytoskeleton으로부터 유리되어 mitochondria로 이동하는 것을 확인하였고, 이에 따라 mitochondria membrane potential이 감소하고, autophagy 및 apoptosis가 유발되었다. 이러한 일련의 변화는 isoprene 또는 actin stabilizing agent의 첨가로 회복됨을 제시하여, 심바스타틴에 의해 isoprenylation의 감소 및 actin cytoskeleton의 손상으로 인해 궁극적으로 혈관 평활근 세포의 독성이 일어남을 시사하였다. 또한, autophagy inhibitor 처리에 의해 apoptosis가 경감되는 것으로, 혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의한 독성이 나타날 때 autophagy가 apoptosis를 촉진하는 역할을 하는 것으로 사료된다. 특히, 혈관 평활근 세포에서 확인한 일련의 현상은 시간 상으로 actin cytoskeleton의 손상과 수축 기능 손상이 먼저 관찰되고, autophagy와 apoptosis가 뒤따라 유발되는 것을 확인하여, 기능적인 손상이 궁극적으로 세포의 사멸을 초래할 수 있음을 제시하였다. 본 연구를 통하여 이때까지는 밝혀지지 않았던 스타틴에 의한 근육 독성의 기전을 actin 손상 및 Bmf 이동을 통한 apoptosis로 규명하였다. 특히 혈관 평활근에서 actin 및 Bmf의 변화에 따른 apoptosis는 본 연구에서 최초로 제시하였으며, 근육 세포 내의 actin

integrity가 수축 기능 손상과 궁극적으로 세포의 apoptosis를 관장하는
중추적인 역할을 하고 있음을 새로이 제시하였다.

Keywords: Simvastatin, Vascular smooth muscle cell, Actin cytoskeleton,
Contractile dysfunction, Autophagy, Apoptosis

목 차

국 문 초 록	i
목 차	iv
List of Figures and Scheme	vi
List of Abbreviations	viii
서 론	1
I. 스타틴 (Statin)	1
I-1. 스타틴의 작용 기전 및 다면적 효과	2
I-2. 스타틴의 부작용 및 근육 독성	3
II. 혈관 평활근 세포 (Vascular smooth muscle cell)	9
II-1. 혈관 평활근 세포의 특이적 phenotype 변화	9
II-2. 혈관 평활근에 대한 스타틴의 효과	10
III. Actin cytoskeleton과 근육 세포의 수축 및 apoptosis 관련성	13
연구 목적	18
실험 방법	21
I. 시약 및 세포 배양	21
II. 혈관 평활근 세포의 RhoA/Rac-1/Cdc42 활성화 확인	22
III. 혈관 평활근 세포의 수축 기능 손상 확인	24

IV. 혈관 평활근 세포의 apoptosis 및 관련 기전 확인	25
V. 혈관 평활근 세포의 autophagy	28
VI. 통계처리	29
실 험 결 과	30
I. 심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 apoptosis 기전	30
I-1. RhoA/Rac-1의 활성 저하에 따른 actin cytoskeleton의 변화	30
I-2. Mitochondrial apoptosis pathway의 전개	35
I-3. Apoptosis	40
I-4. Apoptosis와 수축 기능 손상의 시간적 상관 관계	43
II. 심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 autophagy	47
II-1. Autophagosome 생성 및 autophagy marker의 증가	47
II-2. Autophagy와 apoptosis의 상관 관계	55
고 찰	59
참 고 문 헌	67
Abstract	75

List of Figures and Scheme

Figure 1. Effects of simvastatin on activation of Rho family proteins in primary VSMCs.	32
Figure 2. Effects of simvastatin on F-actin in VSMCs.	33
Figure 3. Reversal effects of simvastatin-induced disruption of F-actin with isoprene supplement in VSMCs.	34
Figure 4. Effects on mitochondrial translocation of Bmf by simvastatin and reversal with isoprene supplement.	37
Figure 5. Reversal of simvastatin-induced Bmf mitochondrial translocation with actin filament stabilization.	38
Figure 6. Effects on mitochondrial membrane potential by simvastatin.	39
Figure 7. Activation of caspase-3 by simvastatin.	41
Figure 8. Effects on apoptosis by simvastatin in VSMCs.	42
Figure 9. Time frame of simvastatin-induced contractile dysfunction <i>in vitro</i>	44
Figure 10. Time frame of simvastatin-induced apoptosis <i>in vitro</i>	45
Figure 11. Comparison of time frame of simvastatin-induced contractile dysfunction and apoptosis <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	46
Figure 12. Simvastatin-induced autophagosome formation analyzed with GFP-LC3 puncta.	50
Figure 13. Simvastatin-induced autophagosome formation analyzed with LC3 immunofluorescence.	51
Figure 14. Effects of simvastatin on autophagy markers and reversal with isoprene supplement or actin stabilization in VSMCs.	52
Figure 15. Effects of simvastatin on autophagy flux in VSMCs.	53

Figure 16. Effects of simvastatin on mTOR pathway and reversal with isoprene supplement or actin stabilization in VSMCs.	54
Figure 17. Rescue effects of autophagy inhibitors on simvastatin-induced apoptosis in VSMCs.	57
Figure 18. Time frame in simvastatin-induced actin disruption followed by autophagy and apoptosis in VSMCs.	58
Scheme. Suggested mechanism of simvastatin-induced myotoxicity in VSMCs. ...	60

List of Abbreviations

BSA: Bovine serum albumin

CPI-17: C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor

DAPI: 4', 6-diamidino-2-phenylindole

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

dUTP: deoxyuridine triphosphate

ECM: Extracellular matrix

ER: Endoplasmic reticulum

FGG: Farnesyl pyrophosphate

GGPP: Geranylgeranyl pyrophosphate

GGOH: Geranylgeraniol

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A

5-HT: Serotonin

Jasp: Jasplakinolide

MLC: Myosin light chain

mTOR: Mammalian target of rapamycin

MYPT-1: Myosin phosphatase target subunit 1

OTC: Over-the-counter

PBS: Phosphate buffered saline

Rap: Rapamycin

ROCK: Rho-associated coiled-coil-forming kinases

SERCA: Sarcoplasmic/ER Ca^{2+} -ATPase

SIM: Simvastatin

TdT: Terminal deoxynucleotidyl transferase

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated deoxyuridine triphosphate
nick end labeling

VSMC: Vascular smooth muscle cell

서론

I. 스타틴 (Statin)

고콜레스테롤혈증 (hypercholesterolemia) 치료제인 스타틴은 혈중 콜레스테롤을 감소시킬 뿐만 아니라 동맥경화, 고혈압 등에 대한 예방 효과가 있다고 알려지면서 다양한 심혈관계 질환자들에게 처방되어 사용되고 있는 약물이다. 실제로 2014년 미국에서 처방 건 수가 많은 약물 25위까지 중에 세 종류의 스타틴이 포함되어 있을 정도로 (simvastatin 5위, atorvastatin 9위, pravastatin 25위) 널리 사용되고 있다 (Aitken, 2014). 또한 최근 American College of Cardiology and the American Heart Association (ACC-AHA)에서 제시한 고콜레스테롤혈증 치료에 대한 새로운 지침에 따라 향후 60세 이상 인구의 70% 이상이 복용을 하게 될 것으로 예상된다 (Pencina *et al.*, 2014). 처방되어 사용되는 것 외에 현재 스타틴을 over-the-counter (OTC) 약물로 전환시키려는 움직임이 있으며, 이미 영국에서는 2004년에 10 mg 심바스타틴이 OTC 약물로 승인되어 사용되고 있어 (Barter and Rye, 2006), 앞으로 스타틴의 사용이 더욱 증가될 것으로 전망된다.

I-1. 스타틴의 작용 기전 및 다면적 효과

스타틴은 콜레스테롤 생합성 과정에서 속도 결정 단계의 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase를 억제하여, HMG-CoA로부터 콜레스테롤의 전구체인 mevalonate가 합성되는 경로를 차단함으로써 혈중 콜레스테롤을 감소시킨다. 그런데 mevalonate는 콜레스테롤뿐만 아니라 squalene, dolichol, farnesyl pyrophosphate (FPP), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP) 등 다양한 물질의 전구체이기도 하다 (Demierre *et al.*, 2005). FPP와 GGPP는 소수성의 긴 탄소 사슬을 가지는 isoprene 류로서 RhoA, Rac-1, Cdc42, Ras와 같은 small GTPase protein을 isoprenyl 시킨다. Isoprenyl된 small GTPase protein은 plasma membrane에 부착하여 활성화되어 세포의 생존/사멸, 증식 또는 actin cytoskeleton organization를 통한 세포의 모양 변화 (shape change), 부착 (adhesion), 수축 (contraction) 등 다양한 역할을 관장한다 (Wang *et al.*, 2008). 이처럼 스타틴은 isoprene의 감소 및 small GTPase protein의 활성 저하를 야기함으로써 혈중 콜레스테롤의 감소뿐만 아니라 다면적 효과 (pleiotropic effect)를 가지는 것으로 알려져 있다.

스타틴에 의한 다면적 효과는 크게 순기능과 부작용으로 나눌 수 있다. 스타틴의 다면적 효과 중 동맥경화나 고혈압에 치료적인 순기능이라 할 수 있는 현상으로는 혈소판 활성화 억제, 혈전 생성 감소, 동맥경화 plaque의 안정화, 혈관 내 염증 반응의 억제, 혈관 내피 세포 기능의 향상, 혈관 평활근의 증식 억제, 혈관 수축 억제 등이 있다 (Takemoto and Liao, 2001). 이러한 작용 중 상당수는 스타틴에 의한

isoprenylation의 감소에 의한 small GTPase protein RhoA 또는 Rac-1의 활성 억제에 기인하는 것으로 알려져 있다. 특히, RhoA의 geranylgeranylation이 스타틴에 의해 억제됨에 따라 tissue type plasminogen activator (t-PA)의 증가 및 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)의 억제, macrophage와 혈관 평활근의 증식 억제가 일어나는 것이 규명되어 있다.

I-2. 스타틴의 부작용 및 근육 독성

스타틴의 부작용으로는 간 독성 (hepatotoxicity), 신경 장애 (neuropathy), 위장 기능 장애 (gastrointestinal disturbances), 근육 독성 (myotoxicity) 등이 보고되고 있어 있는데, 이 중에서도 가장 높은 빈도로 발생하는 부작용은 근육 독성이다 (Golomb and Evans, 2008).

골격근 독성

스타틴에 의한 근육 독성이 주로 발생하는 조직은 골격근 (skeletal muscle)이다. 스타틴의 골격근 독성이 발생하는 빈도는 1-7%이며, 그 양상은 경미한 근육통 (myalgia)이나 근육 약화 (muscle weakness)부터 심각한 횡문근융해증 (rhabdomyolysis)까지 다양하게 보고되고 있다 (Thompson *et al.*, 2003). 횡문근융해증은 근섬유가 붕괴되어 근육 내에 있던 myoglobin이 혈중으로 유리되어 신부전을 유발하고 심한 경우 사망에까지 이를 수 있는 심각한 부작용이다.

일례로 세리바스타틴 (cerivastatin)은 횡문근융해증을 유발해 사망에까지 이르는 사태가 보고되어 시장에서 철수된 바 있으며 (Hodel, 2002), 현재에도 스타틴을 복용하는 환자들을 대상으로 골격근의 증상 및 혈중 creatine kinase 수치를 지속적으로 모니터링 하는 것이 권장될 정도로 골격근에 대한 스타틴의 독성은 중요하게 다루어지는 요인이다 (Stroes *et al.*, 2015).

- 스타틴에 의한 골격근의 apoptosis

스타틴이 골격근 손상을 일으키는 기전을 규명하기 위한 연구가 지속적으로 진행되어 왔는데, 특히 골격근 세포의 apoptosis가 횡문근융해증 및 다양한 근육 독성에 기인하는 대표적인 현상으로 알려져 있다 (Johnson *et al.*, 2004; Mutoh *et al.*, 1999; Sacher *et al.*, 2005). 골격근 세포의 apoptosis가 유발되는 이유에 대해 다양한 이론이 제시되고 있다. 우선, 스타틴에 의한 콜레스테롤 합성이 감소해서 plasma membrane의 integrity가 손상되어, 칼슘 등 이온의 유입이 변화가 생겨 apoptosis를 유발한다는 보고가 있다 (Hodel, 2002). 한편 다수의 연구에서 스타틴에 의한 골격근 세포의 apoptosis가 콜레스테롤이 아닌 GGPP나 FPP의 첨가에 의해서 회복되는 것을 보여, 콜레스테롤 감소보다 isoprene의 감소에 따른 small GTPase protein의 활성 감소가 골격근 독성에 기인한다는 것을 보인 바 있다 (Dirks and Jones, 2006). 이들 연구에서는 isoprene의 감소에 의해 mitochondria의 intrinsic apoptotic pathway가 활성화되는 것으로 제시되어 있지만, isoprene의 감소로 인해 mitochondria의 변화가 일어나는 정확한 기전은 아직 밝혀지지 않아 의문점으로

남아있다.

- 스타틴에 의한 골격근의 수축 기능 손상

스타틴에 의한 근육 독성에서 apoptosis와 더불어 대표적으로 보고되는 현상은 수축 기능의 손상을 들 수 있다. 골격근의 수축 약화를 일으키는 기전으로는 mitochondria의 membrane potential의 감소에 따른 ATP 생성 감소가 제시된다 (Tanaka *et al.*, 2010). ATP 감소에 의해 actin과 myosin의 cross bridge 형성이 억제되고, sarcoplasmic/ER Ca^{2+} -ATPase (SERCA)의 기능 저하 및 그에 따른 sarcoplasmic reticulum (SR)로의 칼슘 uptake가 감소되어 SR로부터 유리되는 칼슘 역시 감소하여 수축력의 약화를 초래한다. 스타틴에 의한 일련의 mitochondria 및 ATP level의 변화는 GGPP의 첨가로 회복되는 것을 보여, isoprene의 감소가 근육 수축 기능 손상에도 중추적인 역할을 하는 것으로 사료된다.

- 스타틴에 의한 골격근의 autophagy

스타틴에 의한 근육 독성의 현상으로 apoptosis 및 수축력 저하와 더불어 최근 autophagy가 근육의 약화 및 횡문근융해증을 일으키는 요인이라는 보고가 많이 되고 있다. 스타틴에 의해 근육 내 autophagy가 일어나는 기전 역시 isoprene의 감소에 따른 small GTPase의 활성 저하로 사료된다. Rab1은 endoplasmic reticulum (ER)으로부터 Golgi apparatus로 vesicle의 이동하는 것 (ER-to-Golgi traffic)에 필수적인 small GTPase로 isoprene GGPP에 의해 활성화된다. 실제로 myofiber에서 스타틴에 의한 GGPP의 감소에 따른 Rab1의 활성 저하에 의해

ER-to-Golgi traffic이 억제되어 근육 세포 내 다량의 vacuole이 축적되며 세포가 사멸하는 현상이 보고되었다 (Sakamoto *et al.*, 2011). 또 다른 small GTPase Rheb은 farnesylation되면 활성화되어 mTOR를 활성화시켜 autophagy를 억제하는데, rhabdomyosarcoma 세포에서 스타틴에 의해 Rheb 및 mTOR가 억제되어 autophagy가 유발되어 근육 독성이 나타나는 것이 연구되어 있다 (Araki *et al.*, 2012). 스타틴에 의한 small GTPase의 활성화 억제 외에 mitochondria의 손상에 의해 autophagy가 일어날 것이라는 연구도 있다. 실제로 스타틴 복용에 따른 근육 부작용이 나타나는 환자의 근육 조직에서 mitochondria DNA 감소가 확인되었고, 이에 따라 mitochondria 손상을 복구하기 위한 mitophagy가 일어날 수 있음이 제시된 바 있다 (Stringer *et al.*, 2013).

Autophagy는 영양분의 고갈에 따른 적응, 세포 내 단백질 및 소기관의 제거, mitochondria 제거, endoplasmic reticulum의 유지 등을 통한 세포의 생존 기전으로 잘 알려져 있다. 일례로 Atg gene의 비활성화를 유도하였을 때 세포가 사멸하는 것이 *in vivo*에서 보고된 바 있다 (Komatsu *et al.*, 2005; Kuma *et al.*, 2004). Atg 5 또는 Atg7을 knockout 시킨 생쥐는 영양분의 고갈로 인해 태어난 지 하루 만에 죽는 경우도 관찰되었다. 반면에, autophagy가 일어남에 따라 오히려 cell death가 증가할 수 있음이 보고되기도 했는데, 이러한 현상은 autophagy에 의한 세포의 죽음으로 이해되고 있으며, autophagy에 의해 사멸이 유도된 경우 necrosis나 apoptosis에 의한 세포의 사멸과 형태적으로 다른 특징을 보인다. 이런 경우를 autophagic death라고 말하는데 autophagic cell death가 일어나면 세포 내에 상당한 양의 autophagosome이 축적되어 있는 것을 관찰할 수 있다 (Kroemer *et al.*, 2009). Autophagy가 세포를 사멸로부터 보호하는 과정인지, 오히려

사멸로 이르게 하는 과정인지에 대해 다수의 연구자들이 설명하고자 노력하고 있으나 정확한 이론은 성립되지 않고 있다. 이에 대해, autophagy를 유발하는 자극의 심각성에 따라 경미한 손상을 입히는 경우 초기 단계에서 손상된 구조를 제거하고 더 이상 손상이 일어나지 못하도록 보호하는 반면, 심각한 손상을 유발할 수 있는 강력한 자극에 대해서는 autophagy로 세포를 보호할 수 있는 범위를 벗어나게 된다는 이론이 있지만 (Martinet and De Meyer, 2009), 스타틴에 의해 근육 조직에서 일어나는 autophagy가 apoptosis에 어떤 영향을 주는지에 대한 생리학적 의의는 아직 불명확하다.

심장근 독성

골격근 손상만큼 빈번하지는 않지만 스타틴에 의한 심장 근육(cardiac muscle)의 손상 또한 보고되고 있다 (Rabkin and Kong, 2003). 스타틴이 심근세포에서 유발하는 유해 반응은 ubiquinone 수치 감소에 따른 심장 기능 손상, 심근 세포의 apoptosis로 인한 viability 감소, 세포 내 actin filament의 퇴화로 나타난다 (Kong and Rabkin, 2004). 또한 스타틴에 의한 심장 근육 세포에서 autophagy도 보고되어 있는데, 이 때 autophagy에 의해 apoptosis가 억제된다는 보고 (Ghavami *et al.*, 2012)와 촉진된다는 보고 (Sabe *et al.*, 2014)가 둘 다 있어, autophagy의 역할은 아직 명확하지 않다. 스타틴에 의한 골격근 독성과 마찬가지로 심장근에 대한 독성 역시 mevalonate 및 isoprene의 첨가에 의해 회복되는 것으로 보고된 연구가 많아 상위 단계의 RhoA 또는 다른 small GTPase의 활성 저하에 기인하는 것으로 사료된다.

스타틴 종류에 따른 독성 정도

스타틴 계열 약물들은 지용성 스타틴과 수용성 스타틴으로 구분할 수 있는데, 특히 심바스타틴은 아토르바스타틴과 더불어 스타틴 계열의 약물들 중에서도 지용성이 큰 약물로 분류된다. 스타틴 제제는 본래 콜레스테롤의 생합성이 일어나는 간세포가 표적인데, 수용성 스타틴 제제는 간세포에만 특이적으로 존재하는 transporter를 통해 세포막의 lipid bilayer를 통과하며 이 수용체가 없는 다른 세포로는 유입되지 못하므로 간세포에서 약리 작용만 일어나고 다른 세포에서의 부작용이 적다 (Sakamoto *et al.*, 2008). 하지만 지용성 스타틴 제제는 수용체 특이적인 방법이 아니라도 세포의 plasma membrane을 용이하게 통과하기 때문에 간세포가 아닌 다른 비특이적인 세포에도 쉽게 들어가서 세포 내의 부작용을 유발할 가능성이 크고, 실제로 다수의 연구에서 근육 세포에 대한 독성 현상이 지용성 스타틴에서 더 크게 나타난 것을 확인할 수 있다 (Chapman and Carrie, 2005; Pierno *et al.*, 1995).

II. 혈관 평활근 세포 (Vascular smooth muscle cell)

II-1. 혈관 평활근 세포의 특이적 phenotype 변화

혈관 평활근 세포는 다른 세포 종류와 구별되는 특징이 있는데, 일반적인 세포들은 한 번 분화가 완료되면 더 이상 phenotype의 변화가 일어나지 않는 반면, 혈관 평활근 세포는 발생 이후 분화가 일어난 후에도 내부적인 자극이나 외부의 환경 변화에 적응하여 phenotype이 변할 수 있다. 혈관 평활근 세포가 나타낼 수 있는 phenotype에는 두 가지가 있는데, 정상적인 상태의 contractile phenotype과 질병상태 (동맥경화, restenosis 등)에서 발현되는 proliferative phenotype 이다 (Michel *et al.*, 2012). 혈관 평활근 세포의 contractile phenotype은 수축에 관여하는 단백질 (α -actin, calponin, SM22 등)을 많이 가지고 있고 actin 및 myosin 등의 contractile machinery가 정렬되어 있어 생리적인 자극에 따라 수축을 원활하게 하여 혈류와 혈압을 탄력적으로 조절할 수 있다. Proliferative phenotype의 혈관 평활근 세포는 수축에 관여하는 성분이 낮게 발현되어 있으며 세포의 증식이 활발하고 extracellular matrix (ECM) 생성이 활발한 상태이다. Proliferative phenotype은 발생 과정이나, 성체에서는 혈관벽이 손상을 입었을 때 발현되는 형질로, 예를 들어, 혈관벽에 손상을 입으면 혈관 내 평활근 세포가 과도하게 증식하고 혈관 내피 층으로 이동하여 또다시 과도하게 증식하여 neo-intima를 형성하기도 한다 (Korff *et al.*, 2013).

II-2. 혈관 평활근에 대한 스타틴의 효과

*Proliferative phenotype*의 혈관 평활근에 대한 효과

최근 스타틴 제제의 혈관 평활근 세포에 대한 효과가 많이 이루어지고 있기는 하나, 대부분의 연구가 고혈압이나 동맥경화 동물 모델에서 실험되었거나 neo-intima의 평활근 세포로 수행되어 정상적, 생리적 상태(normal, physiological state)의 혈관 평활근 세포가 아닌, 증식성(proliferative, synthetic)의 혈관 평활근 세포에서 이루어져 있다. 이러한 연구들은 동맥경화나 고혈압 같은 병적인 상태의 증식성 혈관에서 스타틴 제제에 의해 pro-apoptotic한 Bcl family protein의 발현 증가, anti-apoptotic Bcl family의 발현 감소, cell cycle arrest 등에 의해 혈관 평활근 세포의 apoptosis가 증가하고 증식이 억제되는 것을 확인하였다 (Guijarro *et al.*, 1998). 따라서 이들 연구에서는 병적인 상태의 증식성 혈관에서 스타틴 제제가 세포의 과도한 증식을 차단함으로써 질병 상태를 개선한다고 주장하고 있다.

혈관 평활근에 대한 증식 억제 및 apoptosis 증가 효과와 더불어 혈관에 대한 스타틴의 수축 기능 억제 작용 역시 보고되어 있다 (Wirth, 2010). 스타틴의 혈관 수축 기능 억제에는 isoprene의 감소 및 RhoA의 활성 저하에 따른 Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCK)의 억제가 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Zhou *et al.*, 2011). RhoA와 ROCK는 actin 및 myosin을 통한 세포의 contractile machinery의 형성을 관장하는데, ROCK/LIM-motif containing kinase (LIMK)/Cofilin 또는 mDia를 통해 actin을 nucleation 및 polymerization 시키고 (Geneste *et al.*, 2002), ROCK를

통한 myosin light chain phosphatase의 억제로 myosin light chain (MLC)의 인산화가 증가하는 결과를 초래하여 수축력을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 또한 스타틴에 의한 Rho/ROCK 경로의 억제에 따라 혈관 평활근 내의 myocardin과 α -actin의 gene transcription 감소에 의해 혈관의 수축이 억제된다는 보고도 있다 (Li *et al.*, 2012). 실제로 뇌혈관 및 관상동맥 연축 (cerebral/coronary vasospasm) 또는 고혈압 환자에게서 ROCK의 활성이 증가한 것이 보고되어 있으며, 스타틴이 ROCK 저해제 역할을 함으로써 혈관의 과도한 수축을 억제하는 치료적인 효과가 있을 것으로 해석되고 있다.

Contractile phenotype의 혈관 평활근에 대한 효과

최근 고혈압이나 동맥경화 모델이 아닌, 흰쥐로부터 분리한 정상적인 혈관에서 스타틴에 의해 수축 억제 효과가 나타나는 것이 보고되었다 (Kang *et al.*, 2014a). 수축 억제에 대한 기전으로는 RhoA의 활성 저하에 따른 myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT-1) 및 C-kinase potentiated protein phosphatase-1 inhibitor (CPI-17)의 인산화 감소와 L-type 칼슘 채널을 통한 외부로부터의 칼슘 유입의 감소로 제시되었다. 이와 같은 혈관의 수축 억제는 비가역적인 양상을 보였으며, 혈관 평활근의 apoptosis를 동반하는 점으로 보아 고혈압에서의 치료적인 효과가 아닌 정상 혈관 조직에 대한 스타틴의 독성으로 해석된다. 또한 스타틴을 경구 투여한 *in vivo* 모델에서도 혈관의 수축 기능 손상 (contractile dysfunction)과 구조적 변화 (vascular remodeling) 확인되었다. 특히 *in vivo*로 관찰된 수축 기능 손상과 apoptosis의 시간 및 용량 의존도를 보면 단시간, 저용량 스타틴에 의해서 수축 기능 손상이

선행되고, 장기간, 고용량 투여에서 apoptosis가 뒤따르는 현상이 주목할 만하다 (Woo, 2010). 이에 지속적인 수축 기능의 억제가 세포의 사멸과 구조적인 변화를 야기함이 제시되었는데, 정확한 기전은 밝혀지지 않았다.

III. Actin cytoskeleton과 근육 세포의 수축 및 apoptosis 관련성

Actin은 구형의 monomer인 globular actin (G-actin)이 모여 filament (F-actin)를 이루는 cytoskeleton으로, 세포 내에서 G-actin이 F-actin으로 합성되고, F-actin이 G-actin으로 분해되는 반응이 평형을 이루고 있다. Actin은 myosin과의 interaction을 통해 세포의 수축에 관여하는 것이 잘 알려져 있는데, 뿐만 아니라 세포의 생존에도 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Gourlay and Ayscough, 2005). Yeast에서 actin의 평형이 깨지면 cytosol 내 reactive oxygen species (ROS) 수치가 높아져서 apoptosis가 유발된다는 보고가 있고, mitochondria의 voltage-dependent anion channel (VDAC)의 개폐에 actin이 관여함으로써 mitochondria의 membrane potential ($\Delta\psi_m$)의 변화 및 세포의 생존 및 사멸을 결정한다고 알려져 있다 (Gourlay and Ayscough, 2005). 다수의 연구에서 mammalian cell에서 F-actin과 G-actin의 평형을 깨뜨리는 물질이나 actin binding protein 발현의 변화에 의해 apoptosis가 일어나는 것을 보고하였으며 actin이 세포의 생존 및 사멸을 조절하는 기능을 하는데 대한 기전으로 다양한 이론이 다음과 같이 제시되어 있다.

Cell cycle arrest

Microtubule 뿐만 아니라 actin 역시 mitosis에 관여함으로써 cell cycle을 조절하는 것으로 알려져 있으며, actin을 붕괴시키는 물질에 의

해 cell cycle arrest가 일어나는 것이 알려져 있다. F-actin에 G-actin monomer가 결합하는 것을 막음으로써 F-actin이 짧아지는 결과를 초래하는 물질인 cytochalasin B에 의해 mitosis 단계에서 하나의 세포가 두 개의 세포로 나누어지는 중심인 contractile ring의 형성이 저해되어 cytokinesis가 억제되는 현상이 보고된 바 있다. Latrunculin B는 G-actin에 결합하여 monomer가 F-actin으로 합성되는 것을 차단하는 물질인데, G2 phase의 arrest를 일으켜 apoptosis를 유발하는 것으로 보고되어 있다 (Ahn *et al.*, 2013). 또한 actin이 정상적인 filament를 이루지 못하고 aggregate를 형성하는 경우 Cyclin B1, p27의 증가와 더불어 cell cycle이 S, G2/M phase에 arrest된 현상도 보고되어 (Wang *et al.*, 2014), 정상적인 actin의 integrity가 cell division 및 cell cycle progress에 필수적인 것으로 사료된다.

Mechano-transduction

Mechano-transduction은 matrix의 stiffness나 수축과 같은 물리적인 자극에 의해 일련의 signaling이 전개되어 세포 내부의 전사 인자에 변화를 유발하는 과정으로, myofibroblast나 혈관 평활근과 같은 심혈관계를 구성하는 세포들에서 분화 및 생존에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Parmacek, 2007). 이러한 mechano-transduction에서 cytoskeleton은 actin dynamic의 변화 및 actin과 myosin 사이의 상호작용을 통해 물리적 자극을 세포 내로 전달하는 mechano-sensor 역할을 한다. Actin-myosin을 통한 수축은 megakaryoblastic leukemia 1 (MKL1)을 cytosol로부터 핵으로 이동하게 하고, MKL1의 활성화된 nuclear signal에 의해 Bcl-2의 발현이 증가하여 apoptosis에 저항을

높이고 생존을 하는 것이 myofibroblast에서 연구되었다 (Zhou *et al.*, 2013). 또한 혈관 평활근 세포에서는 MLK이 actin과 직접적인 결합을 할 수 있음이 밝혀졌고 이를 통해 핵 내 전사를 조절해서 세포의 운명을 결정함이 제시된 바 있다 (Long *et al.*, 2013). MKL1/2이 N-terminal의 Arg-Pro-Glu-Leu (RPEL) domain을 통해서 G-actin과 직접적으로 결합을 하는 것이 알려져 있으며, G-actin이 F-actin으로 합성됨에 따라 G-actin에 붙어있던 MKL1/2가 유리되어 핵으로 이동하여 serum response factor (SRF)에 작용한다. 혈관 평활근에서 SRF는 contractile protein들의 발현을 증가시키고, growth response gene의 발현을 조절하며, anti-apoptosis protein인 Bcl-2 및 Mcl-1의 발현을 통해 생존 및 사멸을 결정하는 것으로 보고되어 있다 (Rodenberg *et al.*, 2010).

Cell-cell, cell-matrix adhesion

세포는 인접한 다른 세포 (cell-cell) 및 extracellular matrix (ECM)과의 상호 작용 (cell-matrix)을 통해 분화, 증식, 이동, 생존에 영향을 받는데, 다양한 종류의 cytoskeleton, integrin, signaling molecule들이 scaffold를 이룬 것을 focal adhesion 이라 한다 (McLean *et al.*, 2005). 이러한 focal adhesion을 통한 신호 전달에서 actin이 하위 단계에 있는 focal adhesion kinase (FAK), paxillin, Src kinase 등의 활성을 조절함으로써 세포의 사멸 및 생존을 결정하는 것이 알려져 있다. Actin의 합성이 감소함에 따라 paxillin의 인산화가 감소하고 adherent junction이 감소함에 따라 apoptosis가 일어나는 것이 보고된 바 있다 (Benedetti *et al.*, 2013). 또한 actin의 상위 단계 있는 ROCK를 차단함으로써

FAK의 인산화가 감소하여 apoptosis가 유발되는 현상도 보고되어 있어, RhoA/ROCK를 통한 actin cytoskeleton의 변화가 focal adhesion에 영향을 주어 세포의 생존과 사멸을 결정하는 것으로 사료된다 (Peyre *et al.*, 2012).

BH3-only protein과의 interaction

Bcl protein family는 mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)를 조절함으로써 apoptosis를 관장하는데, Bcl family는 구조적인 차이와 apoptosis에 관여하는 역할에 따라 다시 세 부류로 구분된다. 첫번째, Bcl-2, Mcl-2, Bcl-xL과 같은 단백질은 anti-apoptosis 역할을 하며, 두번째, Bax, Bak과 같이 mitochondria의 pore를 형성하여 pro-apoptosis 역할을 하는 부류가 있으며, 세번째로 BH3-only protein이 있다. 다른 Bcl family 단백질들은 BH1, 2, 3, 4 네 개의 domain으로 구성되어 있는 반면, BH3-only protein들은 하나의 BH3 domain만으로 구성되어 있다. BH3-only protein들은 apoptosis를 초기에 시작하는 단계에서 작용하여 하위 단계에 있는 다른 Bcl 단백질의 anti 또는 pro-apoptosis 활성을 조절하는 switch 역할을 한다. 외부로부터 apoptosis를 유발하는 자극이 오면 BH3-only protein이 활성화되어 anti-apoptotic Bcl protein들의 활성을 억제하고, pro-apoptotic Bcl protein들이 mitochondria에 pore를 형성하여, cytochrome c가 유리되는 apoptosis pathway가 시작된다. 이러한 BH3-only protein들에는 Bid, Noxa, Puma, Bim, Bmf 등이 있는데, 각각의 BH3 단백질은 특이적인 외부 자극에 의해 apoptosis 신호를 시작한다. Bid는 death receptor의 결합에 의해 활성화되고, Noxa와 Puma는 DNA 손상을 감지하여

apoptosis를 시작한다. Bim과 Bmf는 cytoskeleton의 변화를 감지해서 활성화된다 (Pinon *et al.*, 2008). 정상적인 상태에서 Bim과 Bmf는 각각 tubulin과 actin filament에 결합한 상태로 있는데, tubulin 또는 actin filament가 붕괴되면 cytoskeleton으로부터 유리되어 mitochondria로 이동한다. 이동 후 mitochondria에 있는 Bcl-2와 결합하여 anti-apoptosis 활성을 억제하고, Bax/Bak에 의해 pore가 형성되도록 하여, 궁극적으로 apoptosis가 일어나도록 한다.

연구 목적

스타틴은 고콜레스테롤증 치료제로서 현재에도 널리 사용될 뿐만 아니라 앞으로는 그 사용이 더욱 증가할 것으로 전망되는 약물이다. 또한 다른 약물과 달리 장기적으로 복용해야 한다는 특징을 갖고 있기 때문에 위해성에 대해 정확히 규명하는 것이 필수적이다. 가장 높은 빈도로 일어나는 스타틴 약물의 부작용 사례는 골격근에 대한 근육 독성이며, 근육 손상이 심각한 경우 횡문근융해증이 일어나 사망에까지 이르기도 한다. 스타틴에 의해 유발되는 골격근 손상의 증상은 근육 수축력의 저하, autophagy 및 apoptosis로 인한 근육량의 감소로 나타난다. 골격근과 마찬가지로 인체를 구성하는 대표적인 근육 조직인 혈관 평활근은 수축과 이완을 통해 인체 내 적절한 혈압을 유지하고 각 장기와 조직으로 혈액을 공급하는 매우 중요한 조직이다. 골격근과 혈관 평활근은 actin-myosin 구조 및 각종 이온 채널과 같은 근육 세포로서의 공통적인 해부학적, 기능적 특징을 발현하고 있다. 또한 혈관 평활근은 혈류와 직접적으로 접촉하는 조직인 만큼 혈류 내 약물에 노출될 가능성이 매우 높은 조직으로 스타틴에 의한 영향을 받을 가능성이 크다. 실제로 스타틴은 골격근의 수축력 약화와 세포의 사멸을 유발하는 현상과 동일하게 혈관 평활근의 수축을 억제하고 세포의 증식을 감소시키며 apoptosis를 일으키는 것이 보고되어 있는데, 이러한 현상은 고혈압, 동맥경화, 재협착증 (restenosis)과 같은 질병 상황에서 예방 및 치료적인 효과로 해석되어 왔다. 그런데 최근 혈관 평활근에서 수축 억제가 일어나는 현상이 비가역적으로 지속되고 세포의 apoptosis를 일으키며 영구적인 조직의 구조 변화를 일으키는 현상이

보고되어 혈관 평활근에서 관찰되는 수축 억제 현상 역시 골격근에서와 유사한 독성 현상이며, 특히 수축 기능 손상으로부터 세포의 사멸이 유발될 가능성이 제시되었으나 정확한 기전은 규명되지 않았다 (Kang *et al.*, 2014a).

골격근과 혈관 평활근 양쪽에서 스타틴에 의한 수축 기능 손상 및 apoptosis를 유발하는데 isoprene의 감소로 인한 RhoA를 비롯한 small GTPase의 활성 저하가 핵심적인 요인이라는 것이 다수의 연구에 의해 알려져 있다. 또한 스타틴에 의해 mitochondria의 손상, Bcl protein의 발현 변화 등에 의해 apoptosis가 일어나는 것이 규명되어 있다. 하지만 RhoA의 억제가 어떠한 기전을 통해서 mitochondrial apoptosis pathway를 시작 시키는지는 밝혀지지 않았다. 또한 RhoA의 활성 감소로부터 수축 저하가 일어나는 현상과 apoptosis가 유발되는 현상이 각각 별개의 현상으로 보고되어 있으며, 두 현상의 상관관계가 규명된 바 없다.

본 연구에서는 RhoA 작용의 대표적인 하위 단계이면서 수축과 세포 사멸에 동시에 관여하는 표적으로 actin cytoskeleton에 주목했다. 이로써 현재까지 밝혀지지 않은 RhoA로부터 apoptosis가 일어나는 것이 actin의 붕괴에 의해 매개됨을 규명하여 스타틴에 의한 근육 세포의 apoptosis 기전을 명확하게 밝히고자 한다. 또한 혈관 평활근 세포에 대한 스타틴의 작용을 연구한 기존 보고들은 고혈압이나 동맥경화 같은 질병 상태를 반영하여 proliferative phenotype의 혈관 평활근 세포에서 수행되었는데, 본 연구에서는 contractile phenotype의 정상적인 혈관 평활근 세포에서 스타틴에 의한 혈관 수축 기능 손상과 apoptosis를 동시에 밝혀 혈관 근육에 대한 스타틴의 독성을 규명하고자 한다. 또한 수축 손상과 apoptosis에 더해 최근 스타틴의

독성 현상으로 새로이 주목받고 있는 autophagy가 정상적인 혈관 평활근에서도 유도되는지를 확인하고, autophagy가 각각 actin cytoskeleton, 수축 기능 손상, apoptosis와 일련의 상호 작용을 하는지를 규명하여 독성 현상으로서의 autophagy의 역할을 재조명하고자 한다.

실 험 방 법

I. 시약 및 세포 배양

시약

심바스타틴, serotonin hydrochloride (5-HT), geranylgeraniol (GGOH), dimethyl sulfoxide (DMSO), rapamycin (Rap), chloroquine, 3-methyladenine은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다. Jasplakinolide (Jasp)은 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR)에서 구입하였다. Collagenase와 elastase는 Worthington Biochemical Co. (Lakewood, NJ)에서 구입하였고, 세포 배양에 필요한 배지 및 시약은 Gibco Co. (Carlsbad, CA) 제품을 사용하였다. 그 밖의 시약은 모두 특급 시약을 사용하였다.

실험 동물

샘타코 (SamTako, Korea)로부터 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 공급받아 서울대학교 동물실험 연구동 내 온도 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ 및 오전 7시와 오후 7시를 기준으로 12 시간 낮/12 시간 밤 주기의 일정한 환경에서 일주일가량 적응 시킨 뒤 실험에 사용하였다. 일반 사료 (Cargill Agri Purina, Inc., Korea)와 물은 제한 없이 공급하였다. 혈관 평활근 세포의 초대배양에는 150-170 g 흰쥐를 사용하였다.

동물을 사용한 모든 실험 과정은 서울대학교 실험동물자원센터의 윤리 규정을 준수하여 수행하였다.

혈관 평활근 세포의 초대 배양

흰쥐로부터 적출한 흉부대동맥에서 endothelium과 adventitia를 제거하고 잘게 자른 다음, type-2 collagenase 300 unit과 elastase 3 unit을 처리하여 혈관 평활근 세포를 분리하였다. 초대 배양된 혈관 평활근 세포는 95% O₂/5% CO₂ 및 37°C로 유지된 incubator 내에서 배양되었다. 배지는 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin를 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)이 사용되었으며 2-3일 간격으로 교체되었다. 모든 실험에는 passage 1-3인 혈관 평활근 세포를 사용하였다.

II. 혈관 평활근 세포의 RhoA/Rac-1/Cdc42 활성화 확인

***RhoA/Rac-1/Cdc42* 활성 측정**

RhoA/Rac-1/Cdc42의 활성은 Rho/Rac-1/Cdc42 activation assay kit (Cytoskeleton Inc., Denver, CO)를 사용하여 pull down assay의 방법으로 수행하였다. 혈관 평활근 세포를 T-25 flask에서 배양하여 80-90% confluency를 이루었을 때 심바스타틴 및 GGOH를 1 시간

동안 처리한 후 10^{-5} M 5-HT로 10 분 간 활성화 시켰다. 이후 ice 상에서 protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL)을 함유한 cell lysis buffer를 가하고 scraping하여 혈관 평활근 세포를 취하였다. 4°C 에서 9,800 g로 15 분 간 원심분리하여 세포의 debris를 제거하고 상층액을 취하여 활성화된 형태의 RhoA에만 특이적으로 결합하는 rhotekin-RBD bead 또는 활성화된 Rac-1/Cdc-42에 결합하는 PAK-PBD bead를 가하고 4°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 bead를 pull-down 시킨 다음 Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA)에 현탁하여 western blot 하여 각각의 단백질에 특이적인 단일 클론 항체 (Cytoskeleton Inc.)를 사용하여 활성화된 RhoA/Rac-1/Cdc42를 측정하였다.

Western blot

혈관 평활근 세포를 ice 상에서 cold phosphate buffered saline (PBS; 1 mM KH_2PO_4 , 154 mM NaCl, 3 mM Na_2HPO_4 , pH 7.4)로 1회 세척 후 1X protease 및 phosphatase inhibitor cocktail을 함유한 RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 가하여 harvest하였다. Cell debris는 4°C에서 9,800 g로 15 분 간 원심분리하여 제거하고, 상층액 (protein extract)을 취해 protein assay reagent (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용해 단백질을 정량한 후 Laemmli sample buffer에 현탁하여 99°C에서 5 분 간 denaturing 시켰다. Protein extract는 polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리하고, 20% 메탄올을 함유한 Tris/glycine buffer (TG buffer; 25 mM Tris, 192 mM glycine) 내에서 PVDF membrane (Bio-Rad)으로 transfer 하였다. 그런 다음 5%

bovine serum albumin (BSA, Sigma-Aldrich Co.)를 함유한 TG buffer로 상온에서 1 시간 동안 blocking 하고, 각 단백질에 특이적인 일차 항체를 4°C에서 16 시간 이상 (overnight) 부착시킨 후 0.1% Tween20를 함유한 TG buffer로 2 회 세척하였다. 각각의 일차 항체와 부착한 단백질은 horse radish peroxidase (HRP)가 결합된 이차 항체와 반응 시킨 후 Tween20를 함유한 TG buffer로 3 회 세척한 다음 chemiluminescent (ECL; Thermo Fisher Scientific Inc.)를 이용하여 검출하였다. 얻어진 단백질 band는 Image J program (NIH, Bethesda, MD)을 이용하여 정량 하였다.

III. 혈관 평활근 세포의 수축 기능 손상 확인

Myosin light chain (MLC) 인산화 측정

혈관 평활근 세포를 초대 배양한 다음 T-25 flask에서 80-90% confluency를 이루도록 배양하였다. 심바스타틴을 처리한 다음 5-HT 10^{-5} M를 처리하고 37°C에서 10 분 간 stimulation 시켰다. 이후 ice 상에 flask를 두고 cold PBS로 1회 세척 후 1X protease 및 phosphatase inhibitor cocktail을 함유한 RIPA buffer를 가하여 혈관 평활근 세포를 harvest하여, western blot 하였다. MLC 및 phosphor-MLC에 특이적인 일차 항체는 Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA) 제품을 사용하였다.

Actin filament 관찰

혈관 평활근 세포를 collagen으로 coating한 coverslip 위에서 배양한 후 심바스타틴 10 μM 및 GGOH 30 μM 를 4 시간 처리하였다. 4% formaldehyde를 함유한 PBS를 10 분 동안 가하여 고정시킨 다음, 0.5% Triton X-100을 함유한 PBS로 5 분 동안 permeabilization 시킨 후, 2% BSA로 1 시간 동안 blocking 하였다. Actin filament (F-actin)에 특이적으로 염색되는 rhodamine conjugated phalloidin (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 및 G-actin을 염색하는 DNaseI-Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes Inc.)을 1 시간 동안 상온에서 차광하여 염색하였다. 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 300 nM을 1 분 동안 처리하여 핵을 대조 염색하였다. 형광 현미경 관찰에는 Axiovert 200M fluorescence microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany)이 사용되었으며, Image J program을 이용하여 형광 세기를 수치화 하였다.

IV. 혈관 평활근 세포의 apoptosis 및 관련 기전 확인

Mitochondria 분리 및 Bmf의 세포 내 이동 측정

혈관 평활근 세포에 심바스타틴 10 μM , GGOH 30 μM , Jasp 50 nM를 4 시간 동안 처리한 다음, mitochondria isolation kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 세포 내 cytosol 분획과 mitochondria 분획을 나누었다. 혈관 평활근 세포를 ice-cold PBS 상에서 scraper로 긁어서 harvest한 후 차례로 mitochondrial

isolation buffer A에서 2 분, mitochondrial isolation buffer B에서 5 분, mitochondrial isolation buffer C에서 5 분 간 현탁 시켰다. 이후 700 g에서 5 분 간 원심 분리한 뒤, 상층액을 취해 12,000 g에서 20 분 간 원심분리하고 상층액을 취한 것을 cytosol 분획, pellet을 mitochondria 분획으로 하였다. 각각의 분획에서 단백질을 정량한 다음 Laemmli sample buffer (Bio-Rad)에 현탁하여 western blot을 수행하였다. Bmf (Cell Signaling Technology Inc.)에 대한 일차 항체 및 각각의 분획에서의 loading control로서의 cytosol 분획의 α -tubulin, mitochondria 분획의 cytochrome c oxidase (COX) IV (Cell Signaling Technology Inc.)에 대한 항체를 사용하였다.

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) 측정

Cationic fluorochrome JC-1 (Sigma-Aldrich Co.)을 이용하여 $\Delta\psi_m$ 를 측정하였다. JC-1은 정상적인 $\Delta\psi_m$ 를 가지는 mitochondria 안에 축적되어 적색 형광을 나타내는 반면 $\Delta\psi_m$ 가 감소하면 cytosol 내에 monomer 형태로 분산되어 녹색 형광을 띠는 물질이다. 혈관 평활근 세포에 심바스타틴 10 μ M, GGOH 30 μ M, Jasp 50 nM을 4 시간 동안 처리한 후 pre-warmed PBS로 세척하였다. 그런 다음 JC-1을 최종 농도가 2 μ g/ml되도록 PBS에 희석하여 처리하고 37°C에서 15 분 간 반응시켰다. 이후 형광 현미경 관찰은 Carl Zeiss Axiovert 200M 현미경으로 수행하였고, 각각 적색과 녹색 형광 세기를 ImageJ program (NIH)로 수치화 하였다.

Caspase-3 활성화 측정

초대 배양한 혈관 평활근 세포에 심바스타틴을 48 처리한 다음 harvest하여 western blot 하였다. 일차 항체로는 procaspase-3 및 active caspase-3을 공통적으로 인식하는 항체 (Cell Signaling Technology Inc.)를 사용하였으며, weight marker (Bio-Rad)를 기준으로 하여 caspase-3 band의 위치로 35 kDa의 procaspase-3와 17-19 kDa의 active caspase-3를 구분하였다.

TUNEL 염색 (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling)

혈관 평활근 세포의 TUNEL 염색은 Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® Imaging Kit (Molecular Probes Inc.)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 수행하였다. 혈관 평활근 세포를 collagen으로 coating한 cover slip 상에서 배양한 다음, 심바스타틴 10 μ M, GGOH 30 μ M, Jasp 50 nM 또는 vehicle (DMSO)을 처리하고 48 시간 배양하였다. 4% formaldehyde를 함유한 PBS를 15 분 동안 처리하여 고정한 후, 0.25% Triton X-100을 함유한 PBS를 20 분 처리하여 permeabilization 하였다. 다음으로 humidified chamber 상에서 TdT를 함유한 TUNEL reaction mixture를 가하고 37°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. TUNEL 반응 후 Alexa Fluor® 488 azide를 함유한 Click-iT reaction mixture를 30 분 간 실온에서 차광하여 반응시켰다. 핵의 형태를 확인하기 위해 Hoechst 33342을 대조 염색하였다. TUNEL 및 핵 염색

후 혈관 평활근이 부착되어 있는 cover slip을 mounting solution을 가하고 slide glass 위에 고정하였다. Eclipse Ti-U 역상 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan) 및 CSU-X1 confocal scanner (Yokogawa Electric Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 공초점 형광 사진을 얻었다.

V. 혈관 평활근 세포의 autophagy

Autophagosome 확인

Autophagy가 일어날 때 세포 내의 제거되려는 물질이 autophagosome이라고 하는 double-membrane vesicle로 둘러싸인다. 이 때 세포질에 분포하고 있던 LC3가 autophagosome을 구성하는데, GFP로 표지한 LC3를 세포 내로 transfection하여 관찰함으로써 형성된 autophagosome을 녹색 puncta로 관찰할 수 있다. GFP-LC3 DNA를 OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.)에 희석하고, PLUS reagent를 가한 다음, Lipofectamine LTX(Thermo Fisher Scientific Inc.)를 가해 DNA-liposome이 형성되도록 하였다. GFP-LC3 liposome을 chambered cover glass에서 배양한 혈관 평활근 세포에 처리하고 4 시간 동안 37°C에서 transfection 시켰다. 그런 다음 배지를 교환하고 1 시간 후에 심바스타틴 10 μ M 및 vehicle (DMSO)를 24 시간 동안 처리하고 Carl Zeiss Axiovert 200M 형광 현미경으로 관찰하였다.

Autophagy marker 확인

Autophagy가 일어날 때 세포질에 분포하고 있던 LC3 (LC3 I; 16 kDa)가 autophagic vesicle을 구성하는 형태 (LC3 II; 14 kDa)로 전환되며 이것은 autophagy의 지표로 널리 사용되고 있다. Mammalian target of rapamycin (mTOR) 경로는 autophagy를 차단하는 기전으로 잘 알려져 있으며, beclin-1은 초기 vesicle의 nucleation에 기여한다. 혈관 평활근 세포에 심바스타틴 10 μ M을 24 시간 동안 처리한 다음 LC3, beclin-1 (MBL Corp., Japan), mTOR, p-mTOR, S6 kinase, p-S6 kinase (Cell Signaling Technology Inc.) 일차 항체를 사용하여 western blot으로 검출하였다.

VI. 통계처리

실험결과는 mean \pm SEM으로 표시하였다. 두 군 사이의 차이는 t-test로서 검증하였으며, 세 군 이상의 비교에서는 SPSS software (Chicago, IL)를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) test를 수행한 후 Duncan's multiple range test를 실시하여 유의성을 검증하였다. 모든 경우에서 $p < 0.05$ 에서 유의적인 차이가 있다고 판정하였다.

실 험 결 과

I. 심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 apoptosis 기전

I-1. RhoA/Rac-1의 활성 저하에 따른 actin cytoskeleton의 변화

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 RhoA 및 Rac-1의 활성 저하

심바스타틴에 의한 혈관 평활근의 수축 기능 손상 및 apoptosis에 기인하는 기전을 규명하기 위해 먼저 다수의 연구에서 스타틴에 의한 근육 독성에 중추적인 역할을 하는 것으로 제시된 small GTPase RhoA의 활성이 혈관 평활근 세포에서도 변화가 있는지 확인하였다. 활성화된 RhoA에만 결합하는 Rhotekin을 이용한 pull-down assay의 방법으로 측정한 결과, 혈관 평활근 세포에서 심바스타틴 처리에 의해 용량 의존적으로 small GTPase RhoA의 활성이 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 1A). RhoA 뿐만 아니라 스타틴에 의해 활성이 저해되는 것으로 보고된 다른 종류의 RhoA family small GTPase인 Rac-1과 Cdc42의 활성도 측정한 결과, 심바스타틴에 의해 Rac-1 역시 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, Cdc42는 다소 활성이 감소하는 양상을 보였으나 통계적으로 유의적인 변화를 나타내지는 않았다 (Figure 1B). RhoA와 Rac-1으로 대표되는 small GTPase protein은 GTP와 결합한 활성화된 형태는 세포막에 결합한 상태로 존재하고, GDP와 결합한 불활성화된 형태는 세포질에 존재하는데, 활성

GTPase가 세포막에 결합하는데 isoprene 기가 필수적이다. 심바스타틴에 의해 감소한 RhoA와 Rac-1의 활성화는 isoprene geranylgeraniol (GGOH)의 첨가에 의해 회복되는 것을 보여 (Figure 1B), 심바스타틴에 의한 isoprene의 감소에 의해 RhoA 및 Rac-1의 활성화가 저해되는 것을 시사하였다.

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 *actin cytoskeleton*의 변화

RhoA와 Rac-1은 공통적으로 actin cytoskeleton의 형성에 중추적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Etienne-Manneville and Hall, 2002). 심바스타틴에 의한 RhoA와 Rac-1의 활성화 감소가 actin cytoskeleton에 변화를 야기하는지 검증하기 위해, filament를 이루고 있는 polymer 형태의 actin, 즉, F-actin에만 특이적으로 결합하는 phalloidin과 monomer를 이루는 G-actin을 표지하는 DNaseI을 이용해 혈관 평활근 세포 내 actin을 염색하여 관찰하였다. 그 결과, 혈관 평활근 세포 내 F-actin/G-actin의 비율이 심바스타틴 용량의존적으로 감소하는 것을 보여 심바스타틴에 의해 actin cytoskeleton이 붕괴되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2). 다음으로 심바스타틴에 의한 actin cytoskeleton의 붕괴가 isoprene의 감소에 기인하는 것인지 확인하기 위해, 심바스타틴과 동시에 isoprene GGOH를 처리하여 actin 붕괴가 회복되는지를 검증하였다. RhoA와 Rac-1의 저해와 동일한 양상으로, F-actin도 심바스타틴에 의해 감소한 것이 GGOH의 첨가에 의해 회복되는 것을 보여 (Figure 3), 심바스타틴에 의한 isoprene의 감소 및 RhoA, Rac-1의 활성화 저하 때문에 actin cytoskeleton이 붕괴되는 것으로 사료된다.

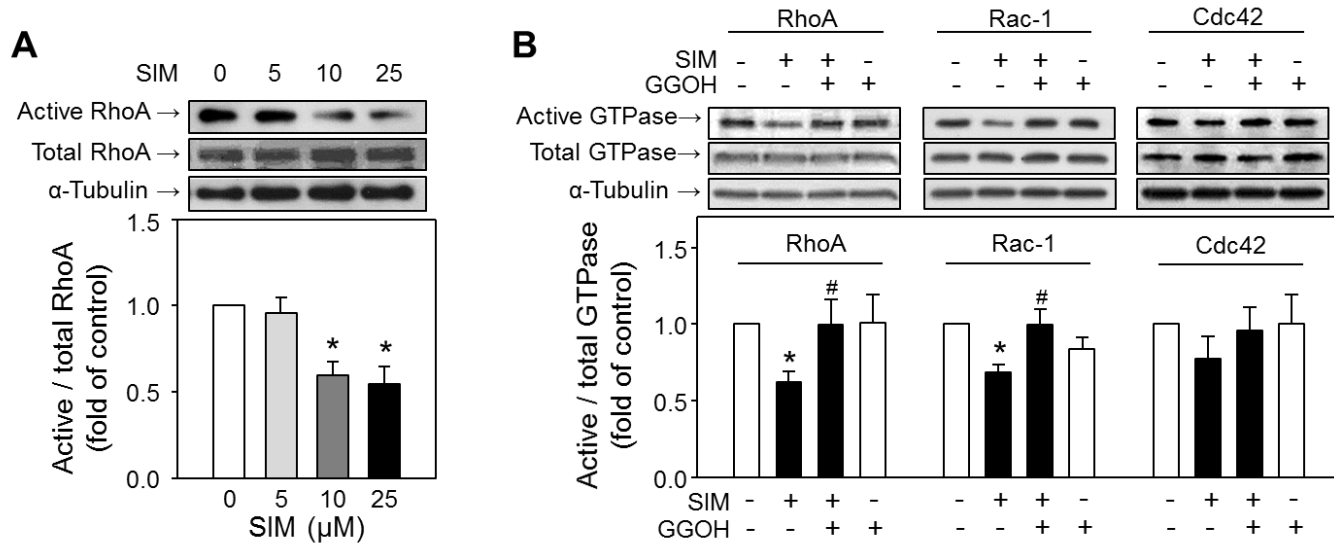


Figure 1. Effects of simvastatin on activation of Rho family proteins in primary VSMCs. (A) Concentration dependent effect of simvastatin (SIM) on RhoA activation was evaluated after treatment of vehicle (DMSO) or SIM (5, 10, 25 μ M for 1 hr), followed by stimulation with serotonin (5-HT; 10^{-5} M, 10 min) to primary cultured rat VSMCs. (B) Effects of SIM on RhoA, Rac-1 and Cdc42 activation and reversal with GGOH supplementation were determined. SIM (10 μ M) and GGOH (30 μ M) were co-incubated for 1 hr. Values are mean \pm SEM of at least four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

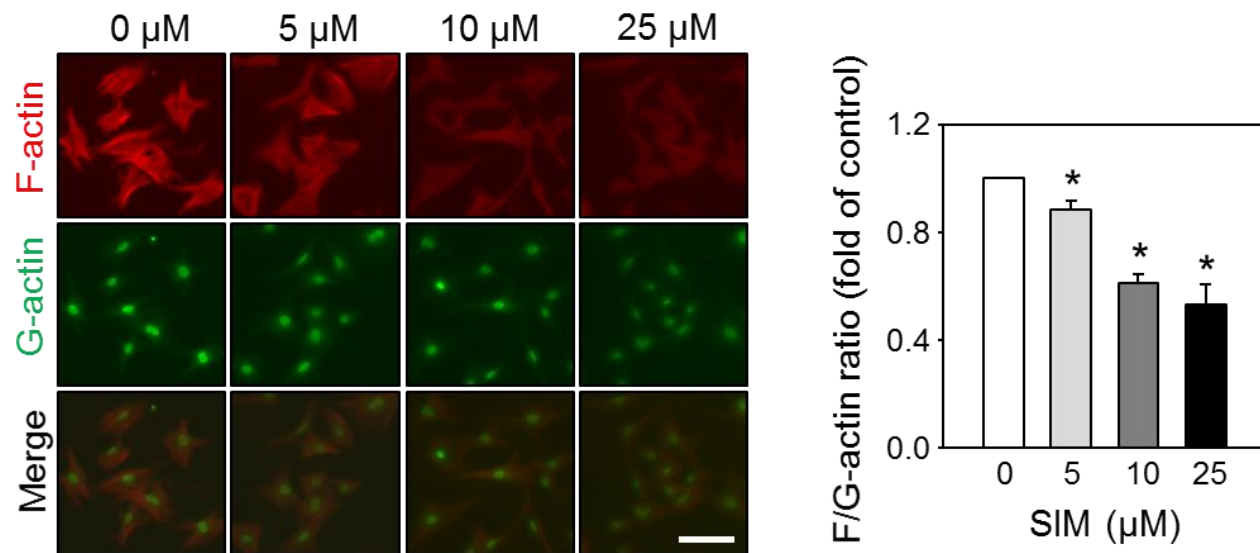


Figure 2. Effects of simvastatin on F-actin in VSMCs. After SIM 10 μM was treated for 4 hr, immunocytochemistry of F/G-actin was investigated with rhodamine-phalloidin (F-actin; red) and DNaseI-Alexa Fluor® 488 (G-actin; green). The intensities of red and green fluorescence were measured and the ratio of F-actin to G-actin was evaluated with each intensity values. Scale bar = 100 μm . Values are mean \pm SEM of four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$).

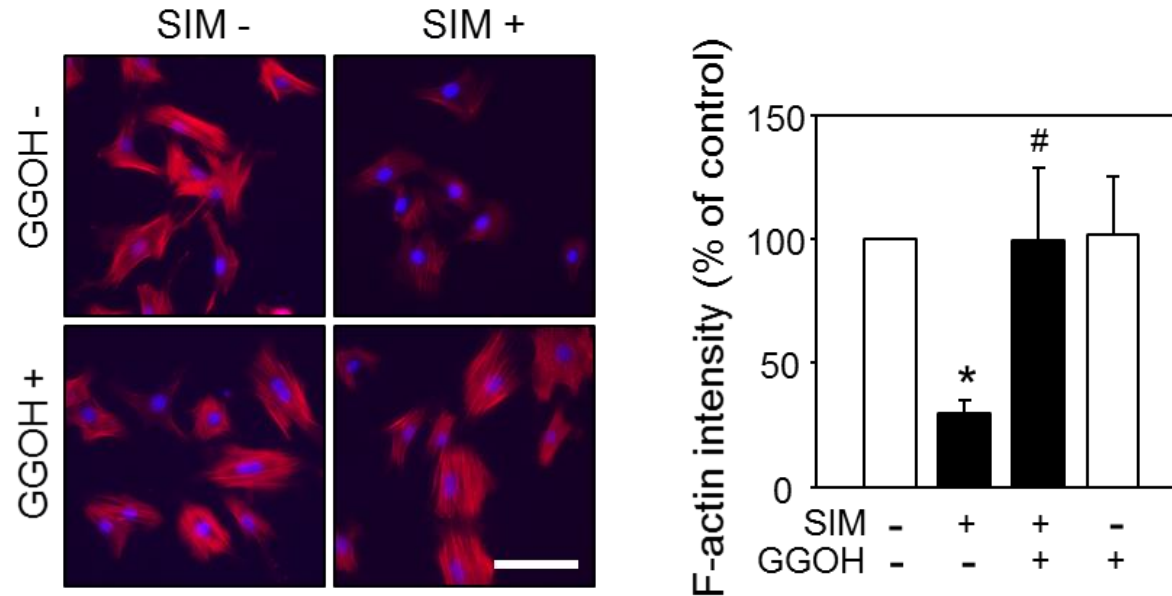


Figure 3. Reversal effects of simvastatin-induced disruption of F-actin with isoprene supplement in VSMCs. Rescue effects of GGOH on F-actin contents were investigated after the co-incubation of SIM 10 μ M and GGOH 30 μ M for 4 hr. Merged images were obtained with rhodamine-phalloidin (F-actin; red) and DAPI (nucleus; blue) stain. Scale bar = 100 μ m. Values are mean \pm SEM of five independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

I-2. Mitochondrial apoptosis pathway의 전개

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포 내 *pro-apoptotic Bmf*의 변화

Bmf는 pro-apoptosis 활성을 가지는 BH-3 only Bcl protein으로, 정상적인 상태에서는 actin cytoskeleton과 결합한 상태로 존재한다. cytoskeleton이 붕괴되면 Bmf는 actin으로부터 유리되어 mitochondria로 이동하여 mitochondria 외막에 존재하는 Bcl-2와 결합하여 Bcl-2의 anti-apoptosis 활성을 억제함으로써 apoptosis를 유발하는 것으로 알려져 있다 (Pinon *et al.*, 2008). 심바스타틴에 의한 actin cytoskeleton의 붕괴에 따라 Bmf의 세포 내 이동이 발생하는지 검증하기 위해 혈관 평활근 세포를 각각 cytosol과 mitochondria 분획으로 나누어, 각각의 분획에서의 Bmf 단백질의 양을 western blot으로 측정하였다. 그 결과, 심바스타틴에 의해 cytosol에서의 Bmf가 감소하고, mitochondria에서는 증가하는 것을 보여, Bmf가 mitochondria로 이동했음을 알 수 있었다 (Figure 4). Bmf의 이동 역시 앞서 확인한 small GTPase RhoA, Rac-1의 활성화 및 actin cytoskeleton의 붕괴와 동일한 양상으로 GGOH에 의해 회복되는 것을 확인하였다 (Figure 4).

다음으로 Bmf의 이동이 actin 붕괴에 기인하는 것인지 검증해보고자 하였다. Jasplakinolide (Jasp)는 actin filament stabilizing agent로 심바스타틴에 의해 감소한 혈관 평활근 세포의 F-actin을 회복시켜주는 것을 확인할 수 있었다 (Supplementary figure 1). Jasp를 심바스타틴과 동시에 처리한 후 actin의 변화가 회복되는지 여부를 확인한 결과, 심바스타틴에 의한 Bmf 이동이 Jasp에 의해 회복되는

것을 확인할 수 있었다 (Figure 5). 이로써 혈관 평활근 세포 내에서 isoprene의 감소에 따른 RhoA, Rac-1의 활성화 저하와 actin cytoskeleton의 붕괴에 의해 Bmf가 mitochondria로 이동함을 제시하였다.

심바스타틴에 의한 *mitochondrial membrane potential*의 감소

Mitochondria 외막으로 이동한 Bmf는 Bcl-2를 저해함으로써 Bax/Bak을 활성화시켜 mitochondria에 pore를 형성하고 mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)을 감소시킨다 (Pinon *et al.*, 2008). JC-1 염색을 통해 mitochondria $\Delta\psi_m$ 을 측정한 결과, 심바스타틴에 의해 혈관 평활근 세포의 $\Delta\psi_m$ 이 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 6A, B). 심바스타틴에 의한 $\Delta\psi_m$ 의 감소 역시 앞서 확인한 Bmf의 이동과 동일한 양상으로 GGOH (Figure 6A) 및 Jasp (Figure 6B)에 의해 회복되는 것을 제시하였다. 따라서 심바스타틴에 의한 isoprene의 감소 및 actin cytoskeleton의 손상에 의해 mitochondria 손상이 야기되는 것으로 사료된다.

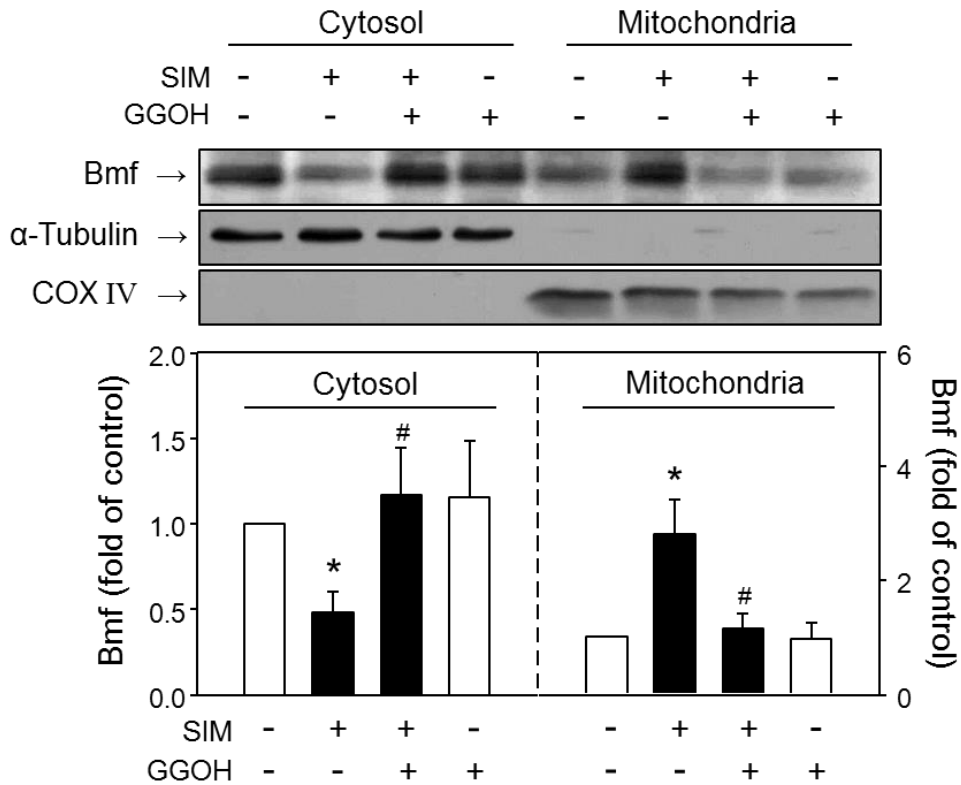


Figure 4. Effects on mitochondrial translocation of Bmf by simvastatin and reversal with isoprene supplement. After SIM 10 μ M and GGOH 30 μ M were co-incubated for 4 hr, cytosolic and mitochondrial fraction were isolated from VSMCs and the amount of Bmf in each fraction was determined. α -Tubulin and cytochrome c oxidase (COX) were used as loading controls for cytosolic and mitochondrial fractions, respectively. Bmf levels for each fractions were normalized with corresponding loading controls. Values are mean \pm SEM of five independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

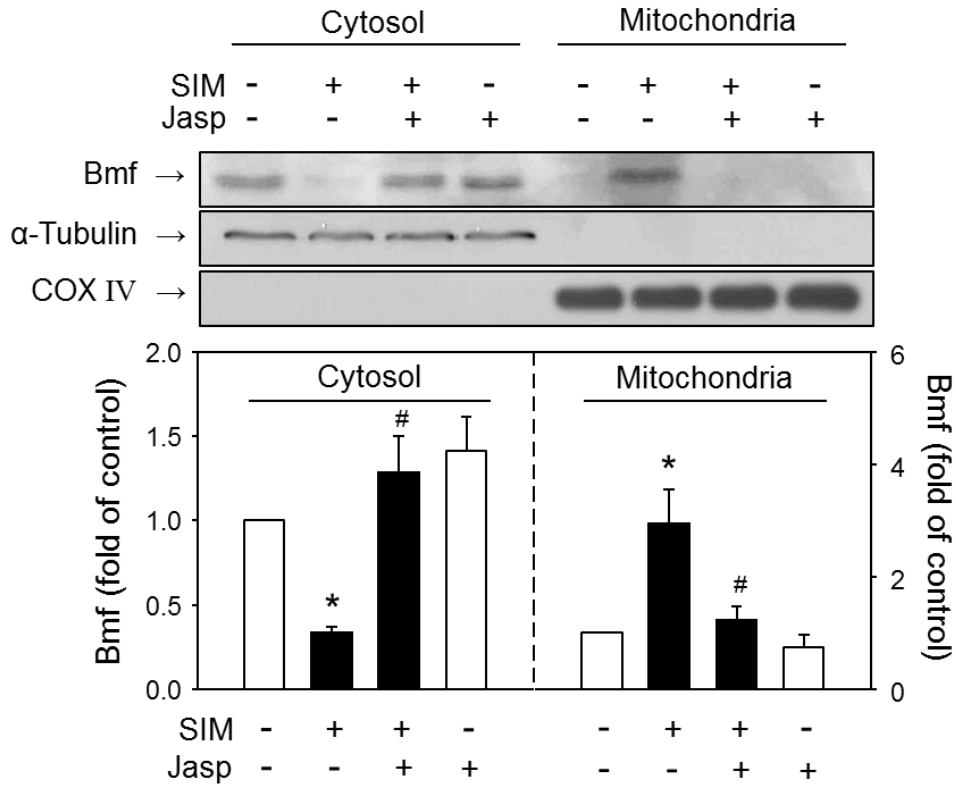


Figure 5. Reversal of simvastatin-induced Bmf mitochondrial translocation with actin filament stabilization. After SIM 10 μ M and Jasp 50 nM were co-incubated for 4 hr, cytosolic and mitochondrial fraction were isolated from VSMCs and the amount of Bmf in each fraction was determined. α -Tubulin and cytochrome c oxidase (COX) were used as loading controls for cytosolic and mitochondrial fractions, respectively. Bmf levels for each fractions were normalized with corresponding loading controls. Values are mean \pm SEM of four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

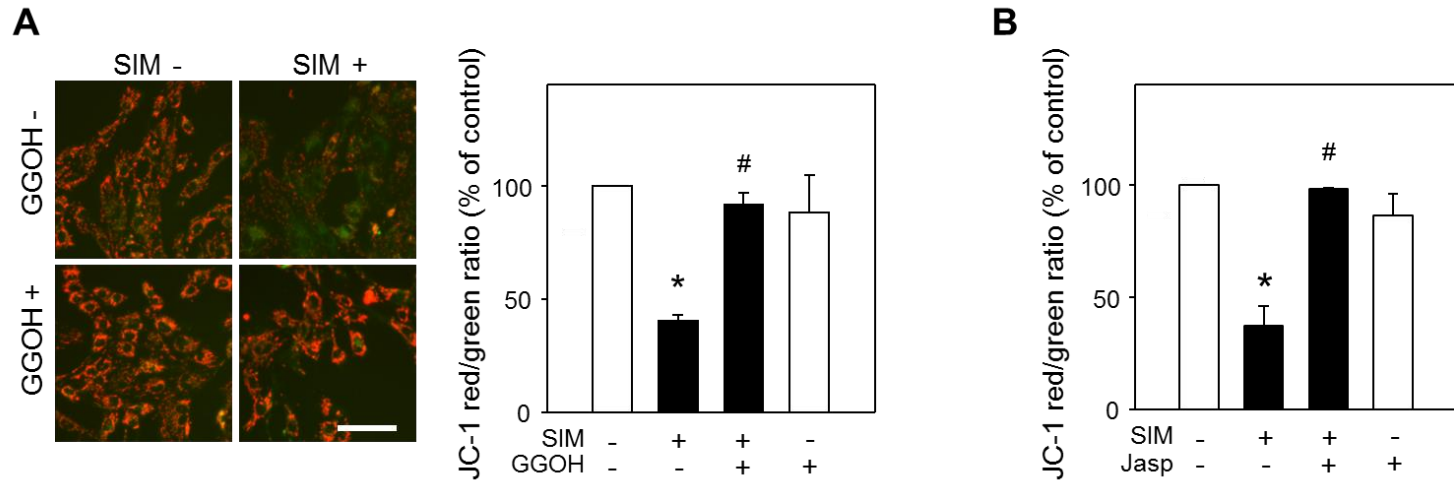


Figure 6. Effects on mitochondrial membrane potential by simvastatin. After SIM 10 μ M and (A) GGOH 30 μ M or (B) Jasp 50 nM were co-incubated for 4 hr, mitochondrial outer membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was determined with JC-1 dye. $\Delta\Psi_m$ was evaluated as a ratio of red to green fluorescence intensity. Values are mean \pm SEM of at least four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$). Scale bar = 100 μ m.

I-3. Apoptosis

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 caspase-3 활성화

Actin cytoskeleton의 손상, Bmf의 mitochondria로의 이동, mitochondria의 $\Delta\psi_m$ 감소는 caspase의 활성화를 통한 apoptosis로 이어진다. Caspase-3는 apoptosis의 지표로, p35 procaspase-3가 p17 caspase-3로 잘리면서 활성을 나타낸다. Caspase-3의 활성을 western blot으로 확인한 결과, 심바스타틴에 용량 의존적으로 활성화된 형태의 cleaved caspase-3가 증가하였다 (Figure 7A). 또한 심바스타틴에 의한 caspase-3의 활성 증가도 앞서 관찰한 다른 지표들과 동일한 양상으로 Jasp로 회복되는 것을 보여 (Figure 7B), actin cytoskeleton의 손상이 caspase-3의 활성화를 유발하는 것임을 제시하였다.

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 apoptosis

마지막으로 혈관 평활근 세포의 apoptosis를 TUNEL 염색 및 Hoechst 33342를 이용한 핵 염색으로 확인하였다. 심바스타틴에 의해 TUNEL positive 세포가 증가함과 동시에 Hoechst 33342로 표지된 핵이 수축된 형상을 보이는 것을 확인함으로써, 궁극적으로 혈관 평활근 세포 내 apoptosis가 일어나는 것을 검증하였다 (Figure 8A, 8B). 또한, 심바스타틴에 의해 증가한 TUNEL positive 세포가 GGOH (Figure 8A)와 Jasp (Figure 8B)에 의해 회복됨을 확인하여, 심바스타틴에 의해 감소한 isoprene과 actin 붕괴가 궁극적으로 세포의 apoptosis를 유발하는 것을 제시하였다.

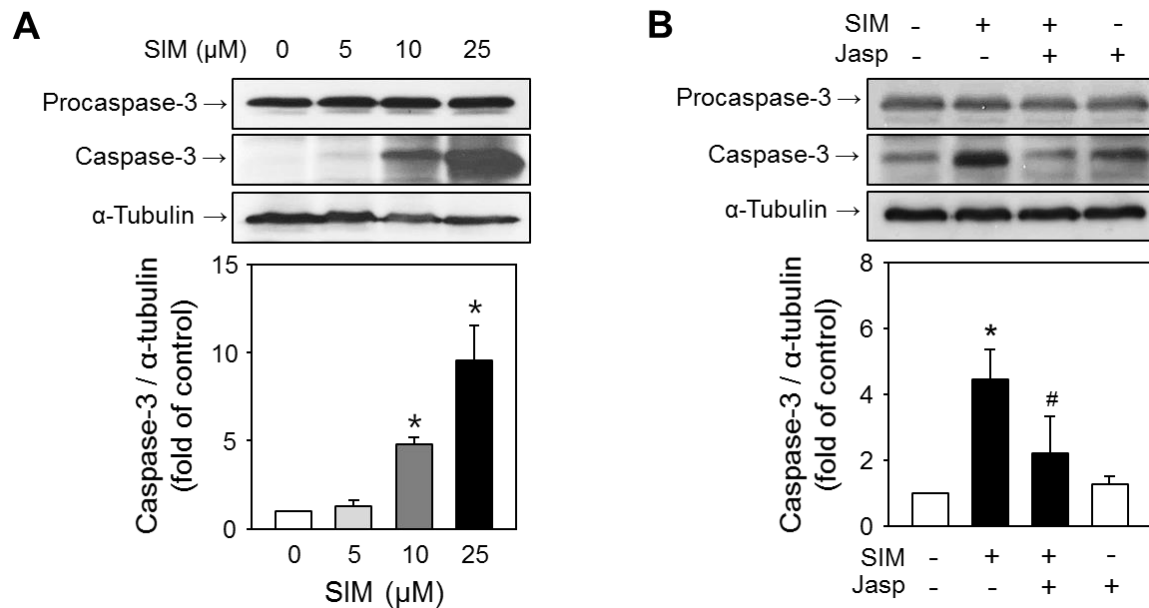


Figure 7. Activation of caspase-3 by simvastatin. (A) After 48 hr incubation with vehicle (DMSO) or SIM (5, 10, 25 μ M) in primary VSMCs, concentration dependent effects on caspase-3 activation were determined. (B) Effect of Jasp on caspase-3 activation was investigated after co-incubation of SIM 10 μ M with Jasp 50 nM for 48 hr. α -Tubulin was used as loading control. Values are mean \pm SEM of at least four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

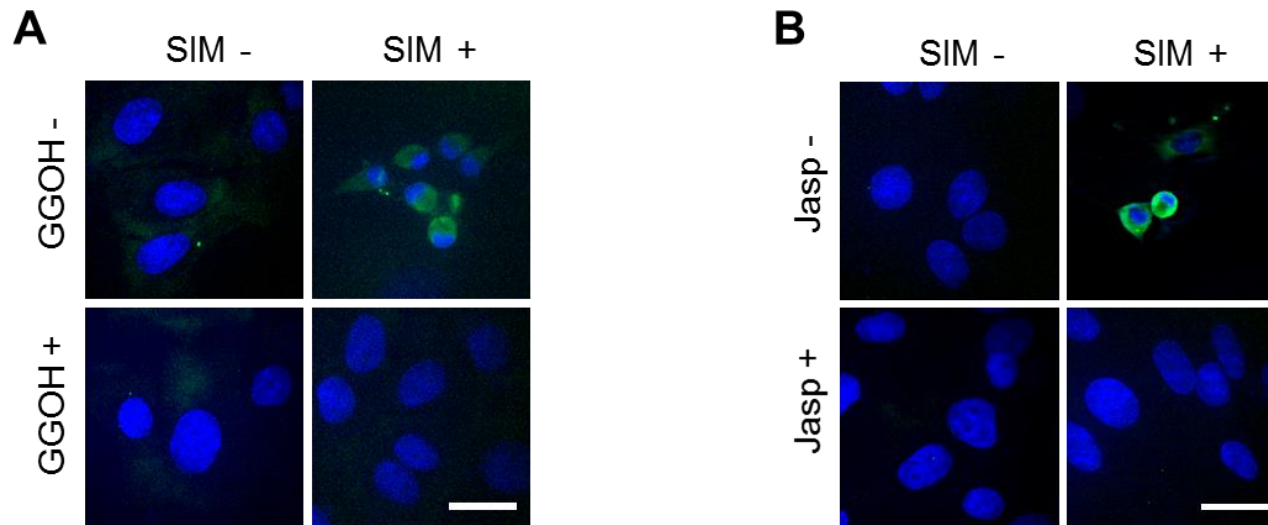


Figure 8. Effects on apoptosis by simvastatin in VSMCs. Apoptosis was determined by TUNEL staining, followed by Hoechst 33342 counterstaining to examine nuclear morphology. Merged images of TUNEL (green) and Hoechst 33342 (blue) were presented. Rescue effects of (A) GGOH or (B) Jasp were determined after SIM 10 μ M with GGOH 30 μ M or Jasp 50 nM was treated for 48 hr. Representative images were obtained from four independent experiments. Scale bar = 30 μ m.

I-4. Apoptosis와 수축 기능 손상의 시간적 상관 관계

혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의한 apoptosis와 수축 기능 손상 (contractile dysfunction)의 time frame

혈관 평활근 세포에서의 수축 기능의 지표로 수축 agonist (세로토닌; 5-HT)에 의한 myosin light chain (MLC) 인산화 정도를 측정하였다. 심바스타틴에 의해 처리 시간 의존적으로 인산화된 MLC (p-MLC)가 감소하는 것을 확인하였다 (Figure 9). 혈관 평활근 세포의 apoptosis는 TUNEL 염색으로 확인하였으며, 역시 심바스타틴에 의해 시간 의존적으로 증가함을 보였다 (Figure 10). p-MLC의 감소와 TUNEL 증가가 유의미하게 보이기 시작하는 심바스타틴 처리 시간을 비교해보면, p-MLC 감소가 1 시간부터 나타나고 TUNEL 증가는 24 시간 이후로 보이는 것을 알 수 있는데, 이로써 contractile dysfunction이 선행되고 뒤따라 apoptosis가 유발되는 것을 확인할 수 있다.

***In vitro*와 *in vivo*에서의 수축 기능 손상과 apoptosis의 time frame 비교**

기존에 *in vivo*에서 심바스타틴 경구 투여에 의해 혈관의 수축 기능 손상이 단기간부터 나타나고 혈관 평활근의 apoptosis가 장기간부터 유발되는 현상을 본 연구진이 보고한 바 있는데 (Woo, 2010), 혈관 평활근 세포에서 *in vitro*로 확인한 기능 손상과 apoptosis의 time frame과 비교해보았다 (Figure 11). 그 결과 *in vitro*와 *in vivo*에서 관찰된 수축 기능 손상과 apoptosis가 동일한 시간적 양상을 보여, *in vitro*와 *in vivo* 모두 심바스타틴에 의해 혈관의 기능적인 손상이 먼저 유발됨에 따라 영구적인 apoptosis가 일어나는 것을 확인할 수 있다.

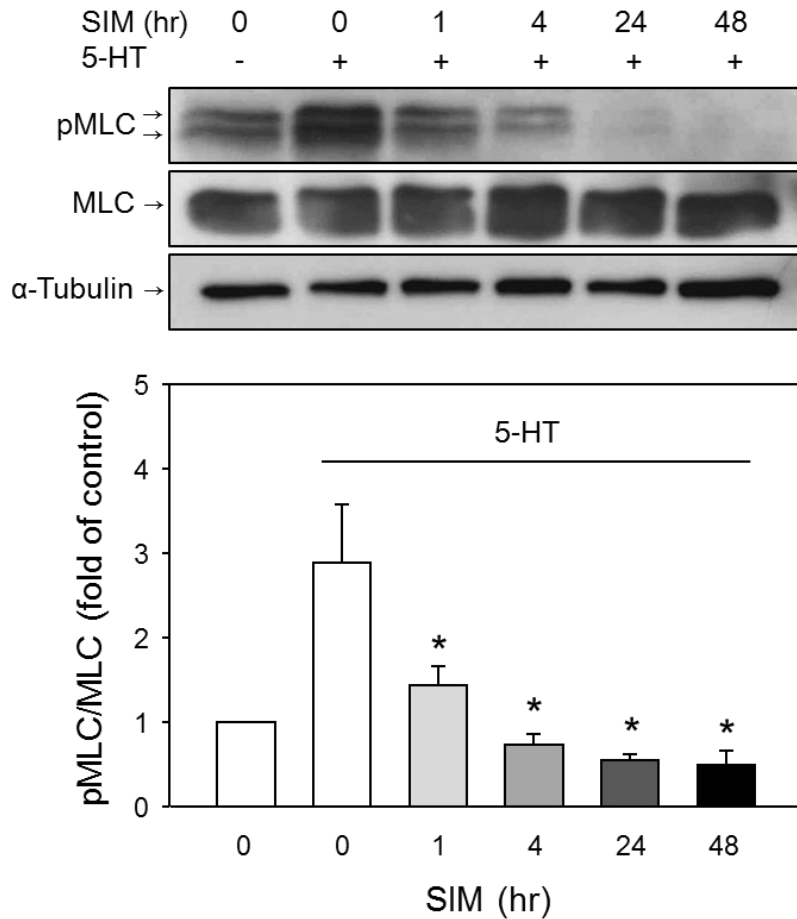


Figure 9. Time frame of simvastatin-induced contractile dysfunction *in vitro*.

After primary cultured VSMCs were treated with SIM 10 μ M for 1, 4, 24 or 48 hr, followed by 5-HT 10^{-5} M stimuli for 10 min, phosphorylation of myosin light chain (MLC) was determined by western blot. Contractile dysfunction of VSMCs was evaluated with ratio of phosphorylated MLC (pMLC) to total MLC. α -Tubulin was used as loading control. Values are mean \pm SEM of six independent experiments. * represents significant differences from the 5-HT control group ($p < 0.05$).

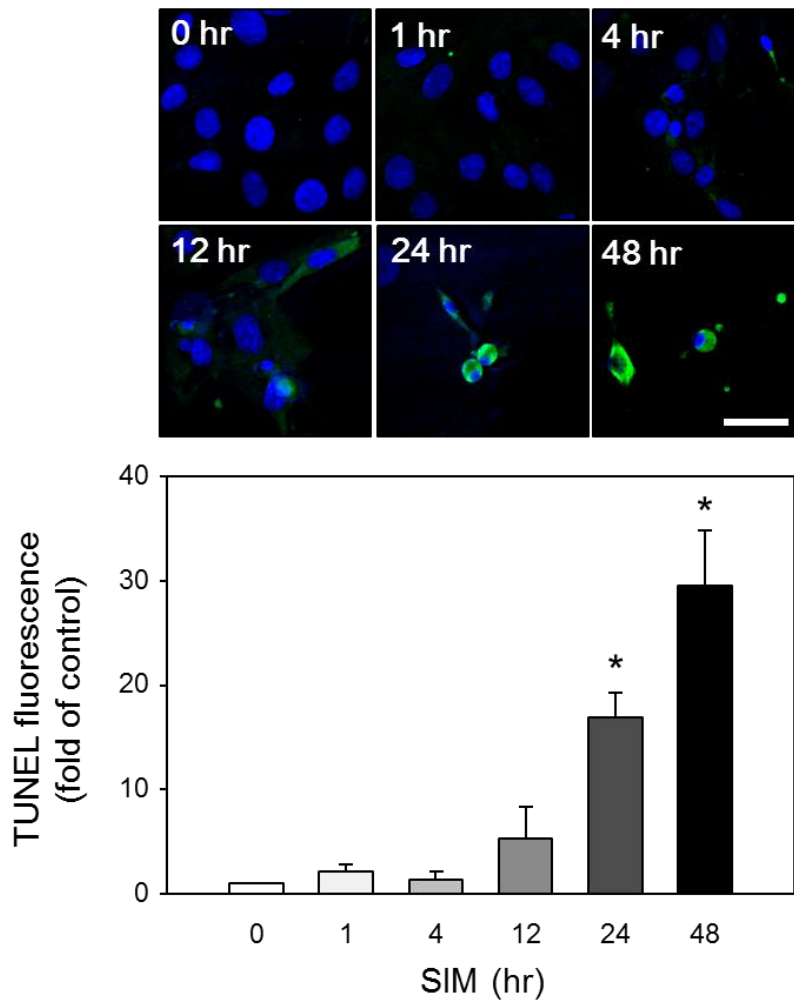


Figure 10. Time frame of simvastatin-induced apoptosis *in vitro*. Effects on apoptosis were determined by TUNEL staining, after primary VSMCs were incubated with SIM 10 μ M for 1, 4, 12, 24 or 48 hr. Merged images of TUNEL (green) and Hoechst 33342 (blue) were presented (upper panel). Scale bar = 30 μ m. Intensity of green fluorescence was measured as a parameter of extent of apoptosis (lower panel). Values are mean \pm SEM of four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$).

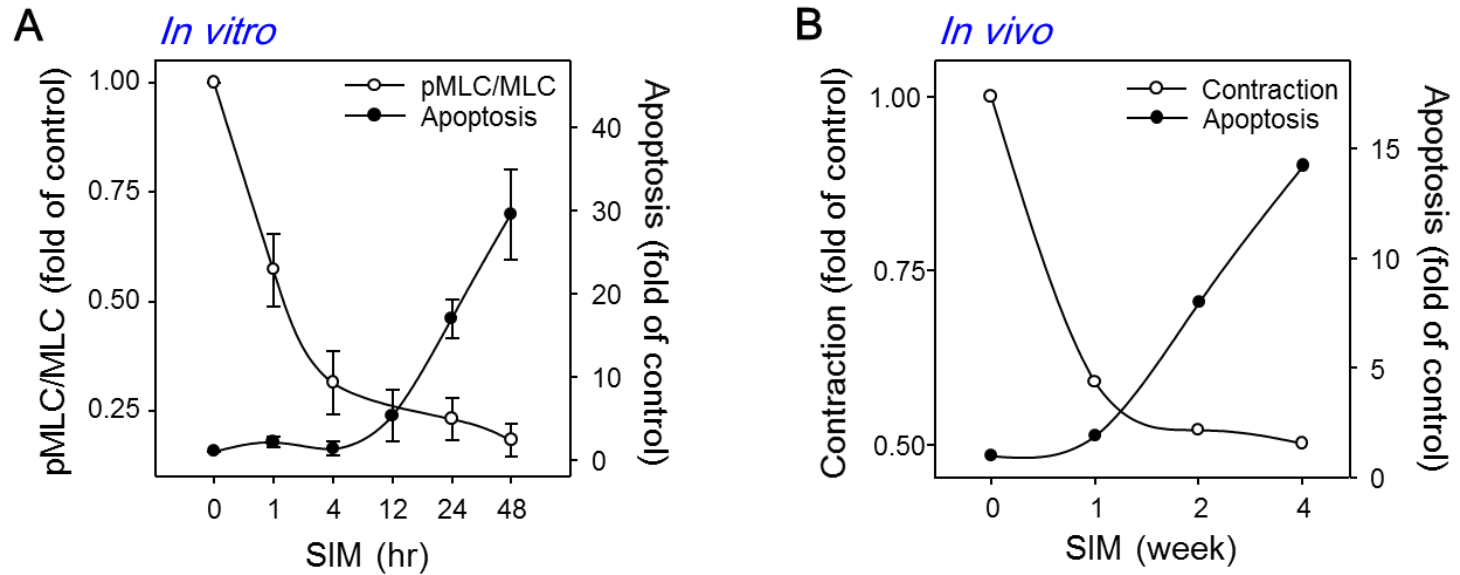


Figure 11. Comparison of time frame of simvastatin-induced contractile dysfunction and apoptosis *in vitro* and *in vivo*.

(A) *In vitro* time-course effects of SIM 10 μ M on the inhibition of MLC phosphorylation and apoptosis in primary VSMCs. Data are summarized from Figure 9 and 10. Values are mean \pm SEM of at least four independent experiments. (B) *In vivo* time-course effects of SIM (10 mg/kg/day, *p.o.*) on contractile dysfunction and apoptosis on rats. Data are re-analyzed with previous results from our group.

II. 심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 autophagy

II-1. Autophagosome 생성 및 autophagy marker의 증가

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포 내 autophagosome 생성

혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의해 autophagy가 유발되는지 확인하기 위해 autophagosome의 형성 여부를 검증하였다. 초대 배양한 혈관 평활근 세포에 green fluorescence protein (GFP)-LC3를 transfection 시킨 다음, 심바스타틴을 처리하고 autophagosome의 지표인 LC3이 puncta를 형성하는지 형광 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 심바스타틴에 의해 녹색 형광을 띠는 puncta가 증가하여 autophagosome이 생성됨을 확인하였다 (Figure 12). 또한, 심바스타틴을 처리한 혈관 평활근 세포를 LC3에 특이적인 항체를 사용하여 면역 염색하여 관찰한 결과 역시 심바스타틴에 의한 autophagosome 형성을 보여주었다 (Figure 13).

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 autophagy marker의 발현 증가

혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의해 autophagosome의 형성과 함께 autophagy 관련 지표들의 발현이 변화했는지 확인하기 위해 혈관 평활근 세포에서 western blot을 하여 autophagy marker를 측정하였다. 심바스타틴에 의해 LC3 I이 LC3 II로 전환되는 것이 확인되었고, beclin-1 역시 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 14A). 심바스타틴에 의해 증가한 LC3 II와 beclin-1은 GGOH의 첨가에 의해 다시 감소함을 보여, isoprene의 감소에 의해 autophagy marker가

증가함을 확인하였다. 또한 Jasp로 LC3 II의 증가가 회복됨을 제시하여, 심바스타틴에 의한 actin cytoskeleton의 손상이 autophagy 유발에 관여함을 시사하였다 (Figure 14B).

심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 autophagy flux 확인

Autophagy는 세포 내 제거되어야 할 물질들이 sequestration 되어 autophagosome을 생성하고, autophagosome이 lysosome과 fusion되어, 궁극적으로 lysosome 내에서 enzyme에 의해 degradation이 일어나는 과정이 순차적으로 일어나는 현상이다. 이렇게 autophagy의 전체 과정이 완료되는 것을 autophagy flux라 한다. Autophagosome의 증가는 autophagy flux가 유발된 상황뿐만 아니라 autophagosome이 lysosome과 fusion 되는 단계가 억제된 경우 autophagosome의 축적을 반영할 가능성도 있다. 따라서 앞서 확인한 심바스타틴에 의한 혈관 평활근 세포의 autophagosome 증가가 autophagy flux가 유발된 것 때문인지 확인하기 위해, autophagosome과 lysosome의 fusion을 차단하는 물질인 chloroquine을 처리하여 LC3 II의 변화량을 측정하였다. 그 결과, 심바스타틴 단독 처리시보다 chloroquine을 함께 처리하였을 때 LC3 II가 더욱 증가하는 것을 확인하여, 심바스타틴에 의해 단순히 autophagosome이 축적되는 것이 아니라 autophagy flux가 유도됨을 검증하였다 (Figure 15A). 또한 심바스타틴을 처리한 혈관 평활근 세포에서의 LC3 puncta로 관찰되는 autophagosome과 LAMP1으로 표지한 lysosome의 co-localization을 확인하여 autophagy flux가 유도되는 것을 한번 더 검증하였다 (Figure 15B).

mTOR pathway의 관련성 확인

Mammalian target of rapamycin (mTOR)는 serine/threonine kinase로서 autophagy의 induction을 조절하는 상위 단계이다 (Shimobayashi and Hall, 2014). 심바스타틴에 의해 유발되는 혈관 평활근 세포의 autophagy에 mTOR의 억제 때문인지 검증하였다. Western blot으로 확인한 결과, 심바스타틴에 의해 mTOR의 Ser2448 위치의 인산화가 미세하게 감소하는 양상을 볼 수 있었다 (Figure 16A, 16B). mTOR의 인산화 정도만으로는 mTOR pathway의 관련성 여부가 확실히 규명되지 않아 mTOR의 하위 단계인 S6 kinase의 인산화 정도를 함께 측정하는 동시에 mTOR 억제의 positive control로서 rapamycin을 사용하여 심바스타틴에 의한 효과와 비교해보았다. 그 결과, mTOR의 인산화 정도보다 명확하게 S6 kinase의 Thr389의 인산화가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 심바스타틴에 의해 mTOR 인산화가 다소 감소하고 S6 kinase의 인산화가 확실하게 감소하는 양상은 positive control인 rapamycin과 흡사하여, 비록 mTOR 인산화의 감소가 미세하게 보였어도 심바스타틴에 의한 mTOR pathway의 억제가 일어났음을 유추할 수 있다. 이처럼 억제된 mTOR pathway는 GGOH (Figure 16A) 또는 Jasp (Figure 16B) 로 회복됨을 보여 심바스타틴에 의한 isoprene의 감소 및 actin 붕괴에 의해 autophagy가 상위 단계의 mTOR부터 작용하여 유발되는 것임을 알 수 있다.

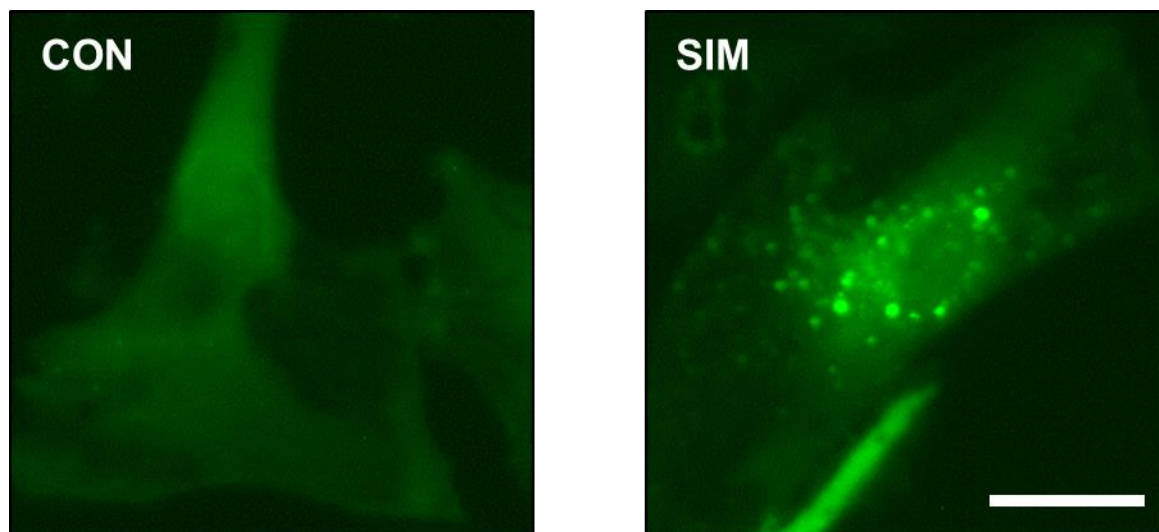


Figure 12. Simvastatin-induced autophagosome formation analyzed with GFP-LC3 puncta. GFP-LC3 plasmid was transfected to primary cultured VSMCs. After transfection, SIM 10 μ M was treated for 24 hr and autophagosomes were determined by GFP-LC3 puncta using fluorescence microscopy. Representative images were obtained from four independent experiments. Scale bar = 30 μ m.

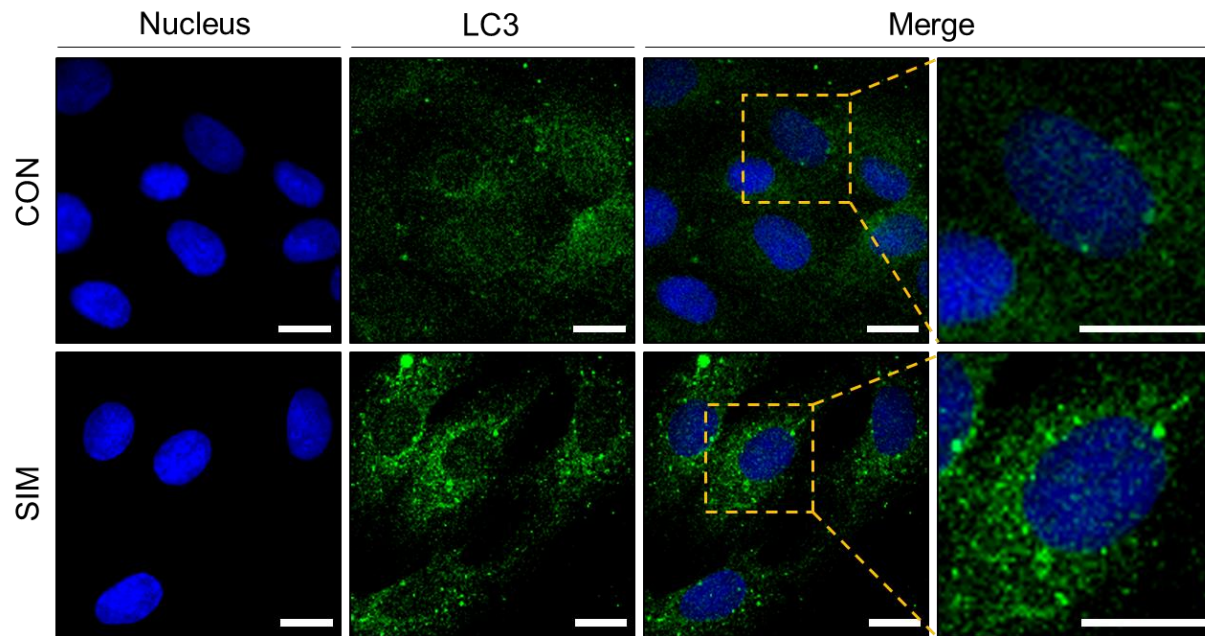


Figure 13. Simvastatin-induced autophagosome formation analyzed with LC3 immunofluorescence. After VSMCs on collagen-coated coverslips were incubated with SIM 10 μ M for 24 hr, VSMCs were fixed with methanol. Immunofluorescence with LC3 antibody conjugated with Alexa Fluor® 488 (green) and Hoechst 33342 (blue) were performed. Scale bar = 5 μ m.

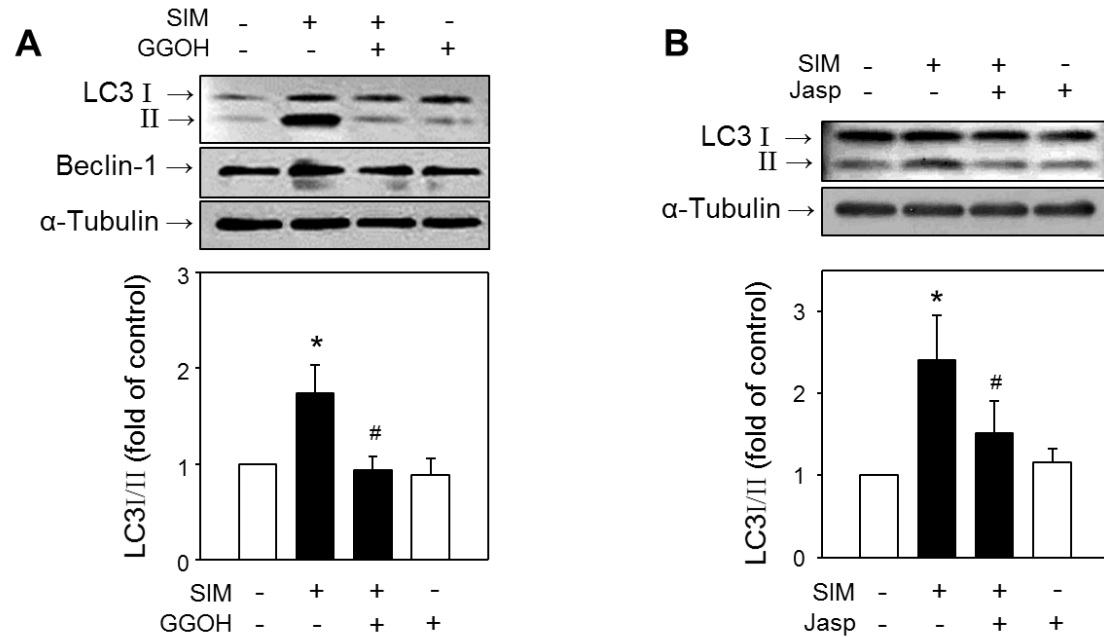


Figure 14. Effects of simvastatin on autophagy markers and reversal with isoprene or actin stabilization in VSMCs.

After SIM 10 μ M and (A) GGOH 30 μ M or (B) Jasp 50 nM were co-incubated for 24 hr, VSMCs were harvested and western blot was performed. Values are mean \pm SEM of at least four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

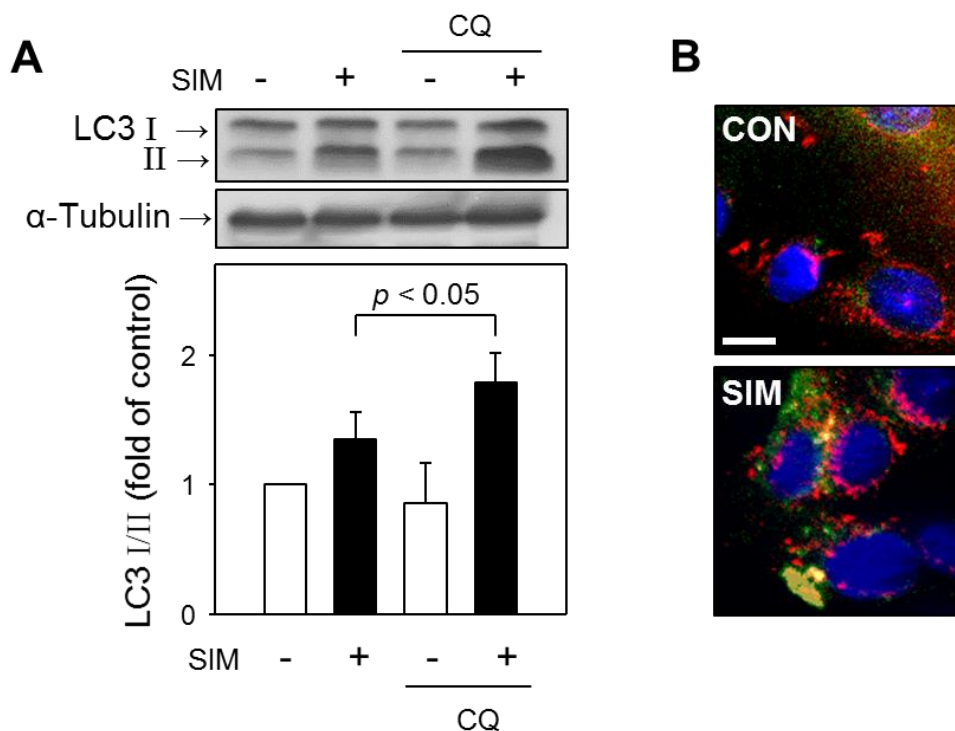


Figure 15. Effects of simvastatin on autophagy flux in VSMCs. (A) After VSMCs were pre-incubated with chloroquine (CQ; 5 μ M) for 1 hr, SIM 10 μ M was treated for 24 hr. VSMCs were harvested and western blot analysis was performed to evaluate the level of LC3. α -Tubulin was used as loading control. Values are mean \pm SEM of three independent experiments. (B) Co-localization of LC3 and lysosome LAMP1 was determined by immunostaining with LC3 antibody conjugated with Alexa Fluor[®] 488 (green), LAMP1 antibody and secondary antibody conjugated with Alexa Fluor[®] 568 (red) after SIM 10 μ M was treated for 24 hr. Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bar = 5 μ m.

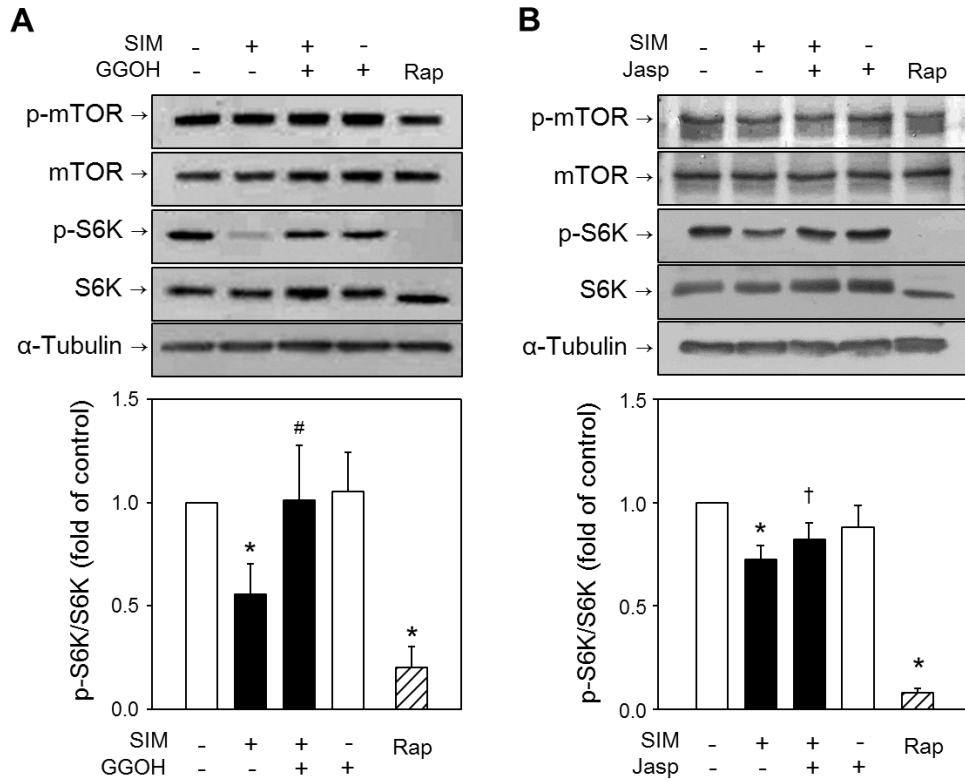


Figure 16. Effects of simvastatin on mTOR pathway and reversal with isoprene supplement or actin stabilization in VSMCs. After SIM 10 μ M and (A) GGOH 30 μ M or (B) Jasp 50 nM were co-incubated for 24 hr, VSMCs were harvested and western blot was performed. Rapamycin (Rap; 100 nM for 24 hr) was treated as positive control for mTOR inhibition. α -Tubulin was used as loading control. Values are mean \pm SEM of at least four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$). † represents differences from the SIM-treated group ($p < 0.10$).

II-2. Autophagy와 apoptosis의 상관 관계

Autophagy inhibitor에 의한 apoptosis의 변화

혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의해 유발된 autophagy와 apoptosis가 둘 다 일어남을 앞서 제시하였는데, autophagy가 궁극적으로 apoptosis에 어떠한 영향을 끼치는지 규명하기 위하여 autophagy inhibitor를 처리했을 때 심바스타틴에 의한 apoptosis 정도의 변화가 있는지를 확인하였다. Autophagy inhibitor로는 phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) 억제제인 3-methyladenine (3MA)와 lysosome 내의 pH를 증가시킴으로써 pH 의존적인 autophagosome과 lysosome의 fusion을 막는 chloroquine을 사용하였다. 혈관 평활근 세포에서 심바스타틴에 의해 caspase-3가 활성화되는 것으로 apoptosis가 일어난 것을 확인하였고, 증가한 caspase-3가 3MA 및 chloroquine에 의해 회복되는 양상을 보였다 (Figure 17). 이는 심바스타틴에 의해 유발된 혈관 평활근 세포의 autophagy가 궁극적으로 apoptosis를 유도하는 것으로 사료된다.

Actin cytoskeleton, autophagy, apoptosis의 시간적 상관 관계

혈관 평활근 세포에서 actin cytoskeleton의 손상, autophagy 및 apoptosis가 심바스타틴에 의해 유발되는 것을 확인하였는데, 일련의 현상들의 시간적 순서를 파악하기 위해 각각의 현상의 시간 의존성을 검증하였다. 먼저 actin cytoskeleton의 감소는 1 시간부터 확인되는 반면 (Figure 18A), autophagy와 apoptosis는 비교적 늦은 시간인

24-48 시간부터 관찰되었다 (Figure 18B). 세 가지 현상을 종합적으로 수치화하여 비교해보면 심바스타틴에 의해 actin cytoskeleton의 붕괴가 선행되면서 autophagy 및 apoptosis가 유발되는 것을 확인할 수 있다 (Figure 18C).

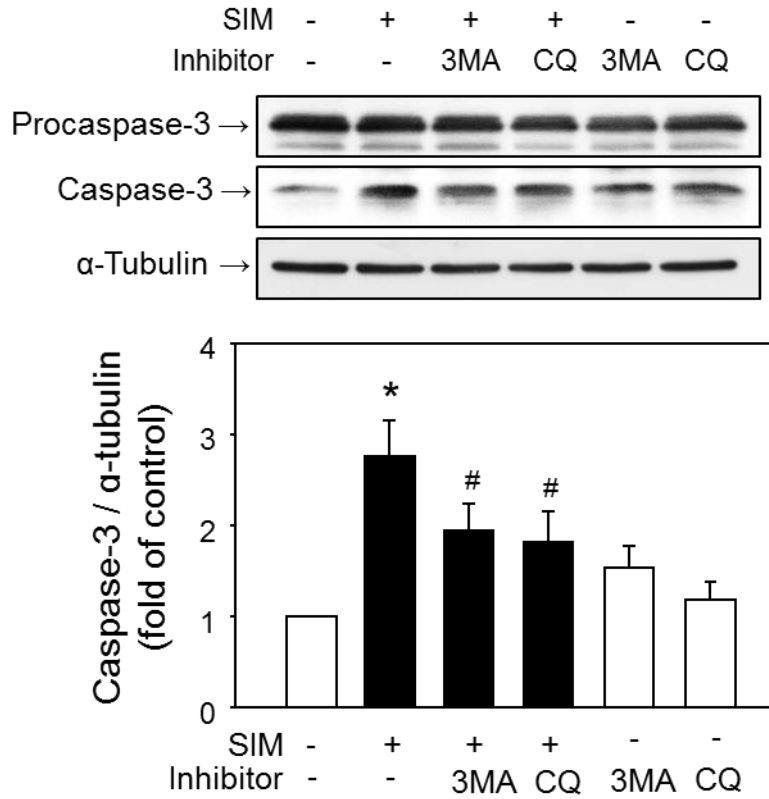


Figure 17. Rescue effects of autophagy inhibitors on simvastatin-induced apoptosis in VSMCs. After VSMCs were pre-incubated with 3-methyladenine (3MA; 5 mM) or chloroquine (CQ; 5 μ M) for 1 hr, SIM 10 μ M was treated for 48 hr. VSMCs were harvested and western blot analysis was performed to evaluate the level of cleaved caspase-3. α -Tubulin was used as loading control. Values are mean \pm SEM of four independent experiments. * represents significant differences from the controls ($p < 0.05$). # represents significant differences from the SIM-treated group ($p < 0.05$).

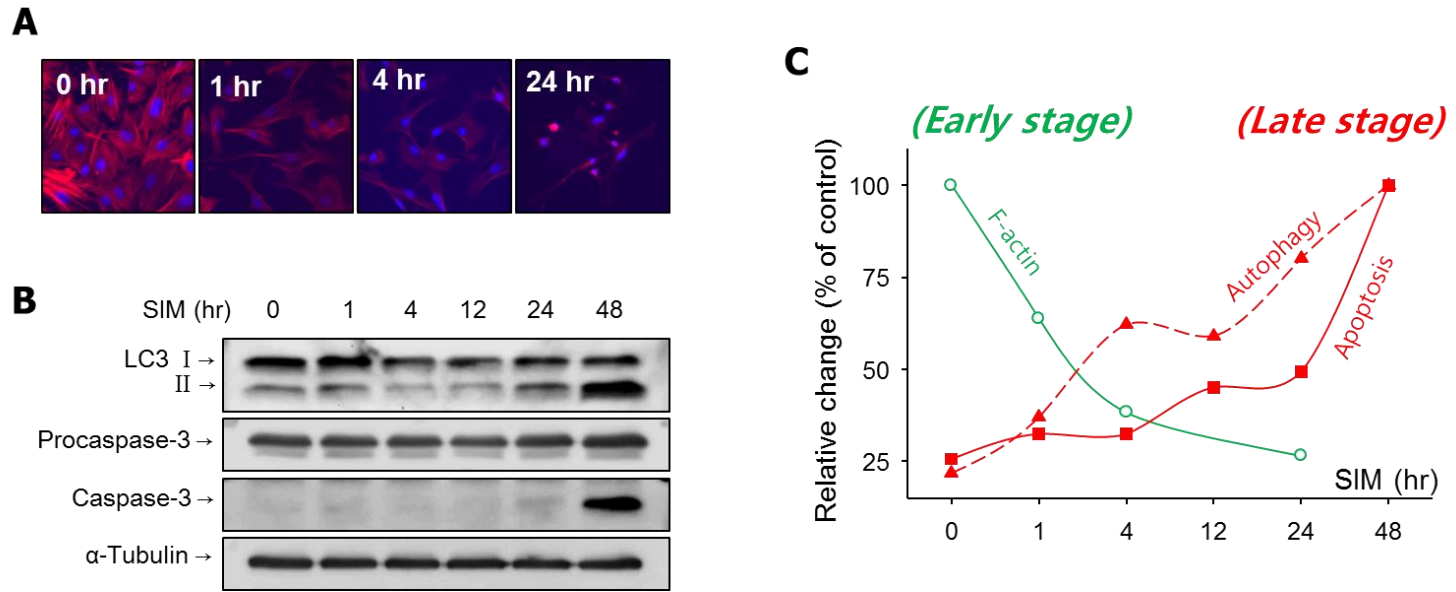
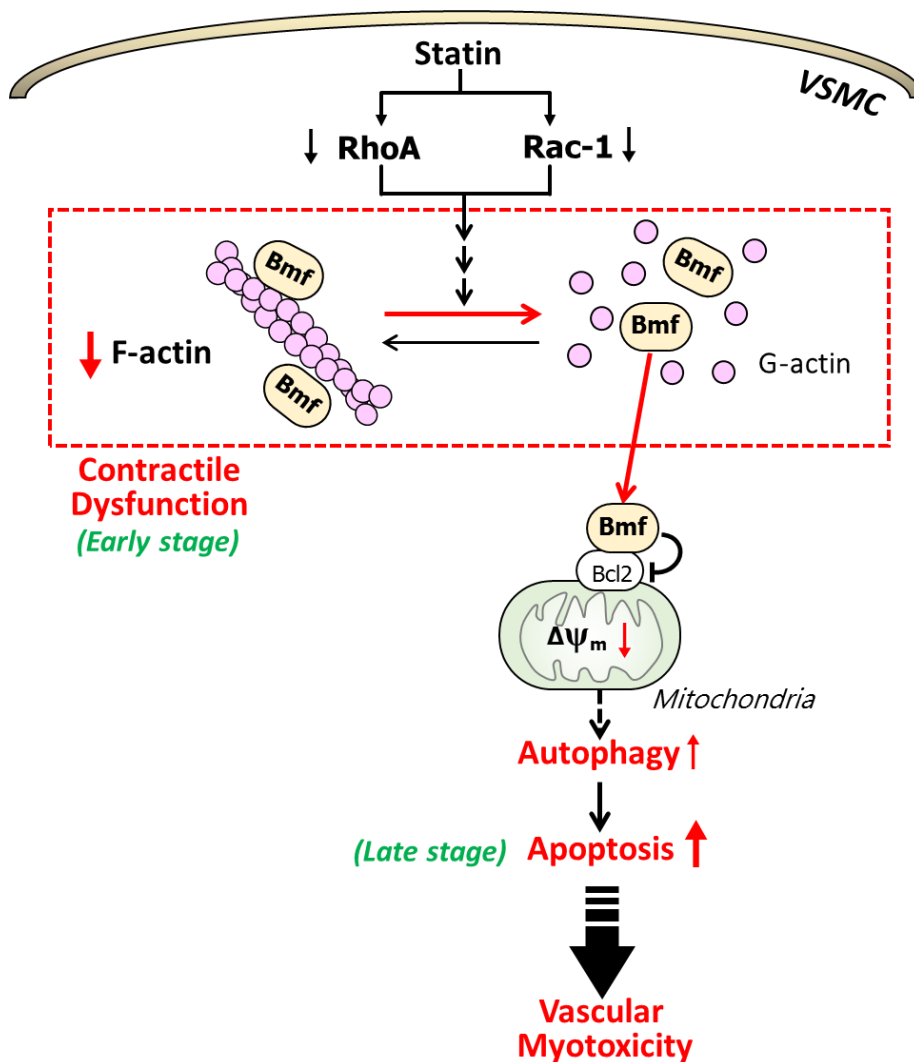


Figure 18. Time frame in simvastatin-induced actin disruption followed by autophagy and apoptosis in VSMCs. (A) VSMCs were treated with SIM 10 μ M for 1-24 hr and immunocytochemistry of F-actin was investigated. Merged images of rhodamine-phalloidin (F-actin; red) and DAPI (nucleus; blue) are presented. (B) After VSMCs were treated with SIM 10 μ M for 1-48 hr, western blot was performed. (C) Summarized data of Figure 18A and B.

고찰

본 연구에서 심바스타틴에 의해 RhoA 및 Rac-1의 활성이 억제됨에 따라 actin 세포골격의 붕괴가 일어나서 수축 기능 손상이 일어나고 autophagy 및 apoptosis가 유발되어 정상적인 혈관 평활근에 독성이 일어남을 제시하였다 (Scheme). 심바스타틴은 RhoA와 Rac-1의 활성을 감소시켰으며 이는 actin filament의 감소, Bmf의 mitochondria로의 이동, mitochondria 막전위의 감소, autophagy, 궁극적으로 apoptosis로 이어지는 일련의 과정을 유발하였다. 특히 이러한 현상은 geranylgeraniol (GGOH) 뿐만 아니라 actin을 보존하는 jasplakinolide (Jasp)의 첨가에 의해 회복되는 것을 보여, actin cytoskeleton의 감소가 심바스타틴에 의해 유발되는 혈관 평활근 독성에서 결정적인 시초가 됨을 시사하고, 스타틴 독성이 RhoA/Rac-1 등의 small GTPase의 활성 저하에 의해 일어나는 과정을 상세히 규명하였다.

현재까지 스타틴의 근육 독성에 대한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 밝혀지지 않은 부분이 상당하며, 스타틴에 의해 나타나는 부작용 증상인 수축 기능 손상과 autophagy, apoptosis가 각각 별개의 현상으로 연구되어 있다. 본 연구에서는 기능적인 손상과 autophagy 및 apoptosis가 한 시스템 내에서 일련의 현상으로 유발됨을 제시하였다. 더 나아가 기능적인 손상이 선행됨을 밝혔고, autophagy 및 apoptosis가 뒤따라 일어나는 것을 보였다. 이처럼 기능적인 변화에 의해 세포의 증식이나 생존/사멸이 영향을 받는 것은 일찍이 다른 근육 조직에서는 알려져 있었다. 일례로, 골격근에서 denervation이나 microgravity와 같은 상황에서 근육을 오랜 기간 사용하지 않았을 경우



Scheme. Suggested mechanism of simvastatin-induced myotoxicity in VSMCs.

Simvastatin (SIM) inhibits the activation of RhoA and Rac-1 which coincides with the degradation of F-actin. Simvastatin-induced F-actin disruption results in inhibition of MLC phosphorylation and contractile dysfunction. Disruption of actin integrity initiates translocation of Bmf followed by mitochondrial dysfunction, autophagy and apoptosis ultimately leading to vascular myotoxicity.

근육 세포의 크기와 수가 감소하는 현상(disuse atrophy in skeletal muscle)이 보고되어 있다. 다른 질병상황으로 인해 유발되는 근육 감소와 다르게 골격근의 disuse atrophy에서는 근육 감소에 선행되어 골격근의 수축력의 감소가 일어나고 이어서 protein degradation의 증가, protein 합성의 감소, 골격근 세포의 apoptosis가 뒤따른다고 보고되어 있다.

이러한 골격근의 disuse atrophy가 일어나는 기전으로 다양한 이론이 제시되어 있는데, calpain, caspase-3, ubiquitin-proteasome, autophagy systems 등 다양한 작용이 근육 세포의 감소에 기여하는 것으로 알려져 있다 (Fanin *et al.*, 2014; Jackman and Kandarian, 2004; Zhu *et al.*, 2013). 또한 다수의 연구에 의해 근육 사용이 장기간 저해되는 상황에서 세포 내 reactive oxygen generation (ROS)의 생성이 증가하는 현상이 공통적으로 보고되어 있는데 (Powers *et al.*, 2012). 이처럼 증가한 ROS 생성을 유발하는 원인으로는 각각의 연구들에서 세포 내 칼슘 동태의 변화, fatty acid hydroperoxide의 증가, mitochondria로의 단백질 수송의 저해 또는 mitochondria의 fission 증가 등으로 다양하게 제시하고 있으나, 수축 활동이 억제되는 기능적 변화가 어떻게 일련의 세포 내 변화를 일으키는지에 대한 정확한 기전은 규명되지 않았다 (Powers *et al.*, 2012). 이처럼 비록 분자적 기전은 명확히 알지 못하지만 현재까지 제시된 현상적 자료들에 근거했을 때, 이는 골격근에서 수축력의 감소가 원인이 되어 결국 세포의 apoptosis를 유발할 수 있음을 제시해주며, 골격근 세포와 유사한 성질을 가지는 혈관 평활근 세포에서, 장기적으로 수축 기능이 저해를 받으면 그 결과로 세포의 apoptosis가 일어날 수 있을 것이라는 가능성을 제시한다. 실제로 심바스타틴 뿐만 아니라

혈관의 수축 기능 저하를 비가역적으로 유발하는 다른 물질들에 의해서도 이와 같은 현상이 알려져 있다. 중금속 비소 대사체인 monomethylarsonous acid (MMA^{III})나 천연물 유래 성분 Rg3에 의해서도 혈관의 수축의 기능 저하가 세포 독성으로 유발되는 것이 보고되어 있어 (Lee *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2011), 본 연구에서 규명한 심바스타틴에 의해 혈관 평활근에서 일어나는 일련의 독성 현상이 물질 특이적인 반응이 아니라 혈관의 기능적 변화를 비가역적으로 야기할 수 있는 상황에서 공통적으로 일어날 가능성이 있다고 사료된다.

근육 조직에서 수축 기능의 손상과 세포의 사멸에 공통적으로 관여할 수 있는 표적으로서 본 연구에서는 actin cytoskeleton에 주목하였다. 실제로 혈관 조직에서 과도한 수축이 지속적으로 유발되면 혈관 평활근을 구성하는 contractile machinery가 증가하는 현상이 보고되어 있어, 수축 활동의 증감에 따라 cytoskeleton의 구성이 변화할 수 있다는 것이 제시된 바 있다. Actin cytoskeleton과 apoptosis 사이의 인과관계는 두 가지 방향으로 해석되고 있다. 우선 apoptosis가 일어나면 그 결과로서 각종 caspase가 활성화되어 actin을 비롯한 다양한 cytoskeleton들을 분해하는 현상이 알려져 있어, apoptosis가 일어난 최종 결과로서의 actin 붕괴가 설명될 수 있다. 골격근에서 스타틴의 독성을 설명할 때, 근육의 수축력이 감소하는 근육의 약화 (muscle weakness)를 골격근 세포의 손상 및 사멸에 따른 결과로 해석하는 것이 지금까지의 견해였다. 실제로 골격근에서 apoptosis가 일어남에 따라 활성화된 caspase들에 의해 cytoskeleton과 같은 수축에 관여하는 구조들이 분해되어 결과적으로 세포의 수축 기능이 저하되는 것이 밝혀진 바 있다 (Du *et al.*, 2004). 하지만 이는 본

연구에 관찰된 심바스타틴에 의해 actin 붕괴가 먼저 관찰되고, apoptosis가 늦은 시간부터 일어난 점과 심바스타틴에 의한 apoptosis가 actin stabilization에 의해 경감되었다는 점을 설명하지 못한다.

반면에 cytoskeleton이 apoptosis를 조절하는 상위단계라는 연구도 다수 있는데, actin 붕괴가 cell cycle arrest, focal adhesion의 변화, mechano-sensing의 저해, BH3 only pro-apoptotic protein의 활성화를 유발함으로써 궁극적으로 세포 사멸에 이르게 한다고 알려져 있다. 본 연구에 이들이 관여할 가능성을 검증해보았을 때, 우선 혈관 평활근 세포에 심바스타틴을 처리하고 배양한 후 cytoskeleton이나 핵의 morphology를 확인하였을 때, cell cycle arrest가 일어났을 때 동반되는 비정상적인 morphology (Du and Hannon, 2004)가 관찰되지 않은 점으로 미루어, 심바스타틴에 의해 cell cycle arrest가 일어나 apoptosis를 유발할 가능성은 적다고 사료되었다. Focal adhesion 및 mechano-sensing의 관련 가능성은 *in vitro* system에서 일어나는 현상을 설명하기에는 부적합한 이론으로 생각되었고, 실제로 focal adhesion에 관여하는 것으로 대표적인 kinase인 FAK의 인산화 정도가 심바스타틴에 의해 영향을 받지 않는 것을 확인하여 배제하였다 (Supplementary figure 2).

BH-3 only Bcl 단백질은 세포의 apoptosis의 가장 초기 단계에 관여하는데, 자극에 의해 가장 먼저 반응하여 apoptosis pathway를 시작하고 하위의 다른 anti-apoptosis 또는 pro-apoptosis 활성을 가지는 Bcl 단백질들을 조절한다. 이 중 Bim과 Bmf는 cytoskeleton의 변화를 인지하여 활성화되어 apoptosis를 일으킨다. 이들 Bim과 Bmf는 정상시에는 각각 tubulin과 actin에 결합한 상태로 존재하다가

cytoskeleton이 붕괴되는 상황이 오면 이로부터 유리되어 mitochondria로 이동하여 apoptosis를 유발한다. 특히 Bim의 활성화는 apoptosis의 정도와 상관이 없이 신속하게 많은 양이 변화되는 것을 보이는 반면, Bmf의 활성화는 동반된 경우에만 세포의 사멸까지 이르는 과정이 완료되는 것이 보고된 바 있어, Bmf가 보다 더 민감하고 결정적인 역할을 하는 것으로 사료된다 (VanBrocklin *et al.*, 2009). Bmf는 최근 cancer cell의 apoptosis를 유발하는 표적 지표로 주목받고 있으며 일례로 paclitaxel은 cytoskeleton의 평형을 붕괴시킴으로써 Bim 및 Bmf에 영향을 끼쳐 세포 사멸을 일으키는 것으로 보고되었다 (Kutuk and Letai, 2010). 또한 histone deacetylase (HDAC) 저해제 역시 Bmf의 활성을 억제함으로써 항암 작용을 나타내는 효과가 제시되기도 하였다 (Kang *et al.*, 2014b). 이처럼 Bmf의 활성화에 의해 세포의 운명이 결정되는 현상이 지금까지는 암세포와 같은 형질전환이 일어난 세포 (transformed cell line)에서는 보고되어 왔지만 본래의 생리적 기능을 유지하고 있는 세포에서 영향을 끼쳐 apoptosis를 유발하는 현상은 본 연구에서 최초로 수축 기능을 보유한 혈관 평활근 세포에서 규명한 것이다. 암세포에서의 Bmf를 매개한 apoptosis 보고에서는 actin cytoskeleton이 adhesion molecule로서의 역할을 하는 것으로 해석된 반면에, 본 연구에서는 수축 기능을 가진 혈관 평활근에서의 actin cytoskeleton 손상에 의한 Bmf 변화 및 apoptosis를 보임으로써, contractile machinery의 손상 및 세포 본래의 고유 성질을 상실했을 때 세포가 사멸할 수 있음을 제시한 것으로 사료된다.

Autophagy는 세포 내 불필요한 물질을 제거하여 에너지 및 새로운 생합성을 하기 위한 원료 물질을 재생산하는 측면에서 세포 내 repair

기전으로 생각되어 왔으나, autophagy vacuole 생성이 동반되는 autophagic death나 autophagy가 apoptosis를 동반하는 현상을 보임으로써 세포 독성의 결과일 가능성도 제시되고 있다. 본 연구에서 확인한 바로는 심바스타틴에 의해 유도된 autophagy는 autophagy inhibitor가 오히려 apoptosis를 경감시킨다는 점에서 repair 기전이 아닌 세포를 사멸로 이끄는 역할을 하는 것으로 사료된다. Autophagy를 유발하는 원인으로는 다양한 현상이 있을 수 있으나 cytoskeleton의 붕괴에 의한 autophagy는 기존에 보고된 바 없다. 오히려 autophagosome이 생성된 것이 lysosome과 fusion되기 위해 이동할 때 actin 및 tubulin network을 따라서 이동을 하게 되므로, cytoskeleton의 손상은 autophagy flux를 억제하며 autophagosome을 과도하게 축적 시킬 가능성이 있다고 유추할 수 있었다. 하지만 실제로 본 연구에서 검증한 결과로는 심바스타틴에 의해 단순히 autophagosome의 축적이 아니라 autophagy flux가 증가된 것이 확인이 되었다. 또한 autophagy 관련 marker LC3 II 뿐만 아니라 autophagy의 시작 단계에서 작용하는 것으로 알려진 mTOR의 억제 역시 actin stabilization에 의해 회복되는 것을 보임으로써 autophagy의 상위 단계에서 actin cytoskeleton의 손상이 방아쇠 역할을 하는 것을 제시하였다. Actin cytoskeleton 손상에 의해 autophagy가 유발되는 기전으로는 본 연구에서 확인한 심바스타틴에 의한 Bmf의 이동에 따른 mitochondria의 손상이 autophagy를 유발시키는 것을 생각할 수 있다. 실제로 손상된 mitochondria가 감지되어 autophagy가 일어나는 것이 알려져 있으며, 이 때 ATP 생성의 감소 및 AMPK의 활성화에 의해 mTOR 억제가 일어나는 것으로 규명되어 있다. 또한 Bmf와 같은 BH3-only protein의 개입을 생각할 수 있는데, 최근 autophagy

protein인 beclin-1이 Bcl-2, Bim, Bcl protein들과 상호 작용함으로써 autophagy 및 apoptosis를 조절하고 있다는 이론이 제시되었다 (Maiuri *et al.*, 2007; Marino *et al.*, 2014). 특히 Beclin-1이 Bmf 및 Bcl-2와 결합한 상태로 actin cytoskeleton과 상호작용할 수 있다는 가능성을 제시한 연구가 있다 (Delgado and Tesfagzi, 2013). 본 연구에서 Bmf의 세포 내 이동만을 확인하였는데, 추가적으로 Bmf가 beclin-1 및 Bcl-2와 association 하는 것의 변화를 검증한다면 actin cytoskeleton이 Bmf를 통해 autophagy 및 apoptosis를 동시에 관장하는 중추로서 작용한다는 것을 확실히 규명할 수 있을 것으로 사료된다.

결론적으로, 본 연구에서 심바스타틴에 의해 초대 배양한 혈관 평활근 세포에서 apoptosis가 일어나는 것을 RhoA/Rac-1의 저하로부터 야기된 actin cytoskeleton의 붕괴 및 그에 따른 Bmf의 mitochondria로의 이동, mitochondria의 손상, 그리고 autophagy 및 apoptosis로 이어지는 일련의 과정을 통해 유발됨을 설명하였다. 특히 심바스타틴에 의해 혈관의 수축 기능 손상이 일어나는 것을 MLC 인산화가 저해되는 것을 보였으며, 이러한 기능적 측면의 독성이 apoptosis에 선행하였으며, actin cytoskeleton의 보존을 통해 apoptosis가 회복됨을 최초로 규명하여 스타틴의 근육 독성에 actin cytoskeleton이 중추적인 역할을 하는 것을 제시하였다.

참 고 문 헌

- Ahn, Y. T., Shin, I. J., Kim, J. M., Kim, Y. S., Lee, C., Ju, S. A., and An, W. G. (2013). Counteracting the activation of pAkt by inhibition of MEK/Erk inhibition reduces actin disruption-mediated apoptosis in PTEN-null PC3M prostate cancer cell lines. *Oncol Lett* **6**, 1383-1389.
- Aitken, M. (2014). Medicine use and shifting costs of healthcare. A review of the use of medicines in the United States in 2013. IMS Institute for Healthcare Informatics.
- Araki, M., Maeda, M., and Motojima, K. (2012). Hydrophobic statins induce autophagy and cell death in human rhabdomyosarcoma cells by depleting geranylgeranyl diphosphate. *Eur J Pharmacol* **674**, 95-103.
- Barter, P. J., and Rye, K. A. (2006). Is it appropriate to make statins available over the counter? The argument against the appropriateness of over-the-counter statins. *Circulation* **114**, 1315-1320.
- Benedetti, G., Fokkelman, M., Yan, K., Fredriksson, L., Herpers, B., Meerman, J., van de Water, B., and de Graauw, M. (2013). The nuclear factor kappaB family member RelB facilitates apoptosis of renal epithelial cells caused by cisplatin/tumor necrosis factor alpha synergy by suppressing an epithelial to mesenchymal transition-like phenotypic switch. *Mol Pharmacol* **84**, 128-138.
- Chapman, M. J., and Carrie, A. (2005). Mechanisms of statin-induced myopathy: a role for the ubiquitin-proteasome pathway? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 2441-2444.
- Delgado, M., and Tesfagzi, Y. (2013). BH3-only proteins, Bmf and Bim, in autophagy. *Cell cycle* **12**, 3453-3454.
- Demierre, M. F., Higgins, P. D., Gruber, S. B., Hawk, E., and Lippman, S. M. (2005). Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* **5**, 930-942.

- Dirks, A. J., and Jones, K. M. (2006). Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. *American journal of physiology. Cell Physiol* **291**, C1208-1212.
- Du, J., and Hannon, G. J. (2004). Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion. *Proc Natl Acad Sci* **101**, 8975-8980.
- Du, J., Wang, X., Miereles, C., Bailey, J. L., Debigare, R., Zheng, B., Price, S. R., and Mitch, W. E. (2004). Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest* **113**, 115-123.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Fanin, M., Nascimbeni, A. C., and Angelini, C. (2014). Muscle atrophy, ubiquitin-proteasome, and autophagic pathways in dysferlinopathy. *Muscle Nerve* **50**, 340-347.
- Geneste, O., Copeland, J. W., and Treisman, R. (2002). LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J Cell Biol* **157**, 831-838.
- Ghavami, S., Yeganeh, B., Stelmack, G. L., Kashani, H. H., Sharma, P., Cunnington, R., Rattan, S., Bathe, K., Klonisch, T., Dixon, I. M., Freed, D. H., and Halayko, A. J. (2012). Apoptosis, autophagy and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell Death Dis* **3**, e330.
- Golomb, B. A., and Evans, M. A. (2008). Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs* **8**, 373-418.
- Gourlay, C. W., and Ayscough, K. R. (2005). The actin cytoskeleton: a key regulator of apoptosis and ageing? *Nature reviews. Mol Cell Biol* **6**, 583-589.
- Guijarro, C., Blanco-Colio, L. M., Ortego, M., Alonso, C., Ortiz, A., Plaza, J. J.,

- Diaz, C., Hernandez, G., and Egido, J. (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* **83**, 490-500.
- Hodel, C. (2002). Myopathy and rhabdomyolysis with lipid-lowering drugs. *Toxicol Lett* **128**, 159-168.
- Jackman, R. W., and Kandarian, S. C. (2004). The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C834-843.
- Johnson, T. E., Zhang, X., Bleicher, K. B., Dysart, G., Loughlin, A. F., Schaefer, W. H., and Umbenhauer, D. R. (2004). Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone. *Toxicol Appl Pharmacol* **200**, 237-250.
- Kang, S., Woo, H. H., Kim, K., Lim, K. M., Noh, J. Y., Lee, M. Y., Bae, Y. M., Bae, O. N., and Chung, J. H. (2014a). Dysfunction of vascular smooth muscle and vascular remodeling by simvastatin. *Toxicol Sci* **138**, 446-556.
- Kang, Y., Nian, H., Rajendran, P., Kim, E., Dashwood, W. M., Pinto, J. T., Boardman, L. A., Thibodeau, S. N., Limburg, P. J., Lohr, C. V., Bisson, W. H., Williams, D. E., Ho, E., and Dashwood, R. H. (2014b). HDAC8 and STAT3 repress BMF gene activity in colon cancer cells. *Cell Death Disease* **5**, e1476.
- Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K., and Chiba, T. (2005). Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**, 425-434.
- Kong, J. Y., and Rabkin, S. W. (2004). Cytoskeletal actin degradation induced by lovastatin in cardiomyocytes is mediated through caspase-2. *Cell Biol Int* **28**, 781-790.
- Korff, T., Pfisterer, L., and Schorpp-Kistner, M. (2013). miR-663 and the miRaculous vascular smooth muscle phenotypic switch. *Circ Res* **113**,

1102-1105.

- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Green, D. R., Hengartner, M., Knight, R. A., Kumar, S., Lipton, S. A., Malorni, W., Nunez, G., Peter, M. E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., and Melino, G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Diff* **16**, 3-11.
- Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**, 1032-1036.
- Kutuk, O., and Letai, A. (2010). Displacement of Bim by Bmf and Puma rather than increase in Bim level mediates paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Cell Death Diff* **17**, 1624-1635.
- Lee, J. Y., Lim, K. M., Kim, S. Y., Bae, O. N., Noh, J. Y., Chung, S. M., Kim, K., Shin, Y. S., Lee, M. Y., and Chung, J. H. (2010). Vascular smooth muscle dysfunction and remodeling induced by ginsenoside Rg3, a bioactive component of ginseng. *Toxicol Sci* **117**, 505-514.
- Li, J., Jiang, J., Yin, H., Wang, L., Tian, R., Li, H., Wang, Z., Li, D., Wang, Y., Gui, Y., Walsh, M. P., and Zheng, X. L. (2012). Atorvastatin inhibits myocardin expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **60**, 145-153.
- Lim, K. M., Shin, Y. S., Kang, S., Noh, J. Y., Kim, K., Chung, S. M., Yun, Y. P., and Chung, J. H. (2011). Potentiation of vasoconstriction and pressor response by low concentration of monomethylarsonous acid (MMA(III)). *Toxicol Lett* **205**, 250-256.
- Long, X., Cowan, S. L., and Miano, J. M. (2013). Mitogen-activated protein kinase 14 is a novel negative regulatory switch for the vascular smooth muscle

- cell contractile gene program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**, 378-386.
- Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 741-752.
- Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 81-94.
- Martinet, W., and De Meyer, G. R. (2009). Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circ Res* **104**, 304-317.
- McLean, G. W., Carragher, N. O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V. G., and Frame, M. C. (2005). The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer* **5**, 505-515.
- Michel, J. B., Li, Z., and Lacolley, P. (2012). Smooth muscle cells and vascular diseases. *Cardiovasc Res* **95**, 135-137.
- Mutoh, T., Kumano, T., Nakagawa, H., and Kuriyama, M. (1999). Role of tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma1 in the signaling pathway of HMG-CoA reductase inhibitor-induced cell death of L6 myoblasts. *FEBS lett* **446**, 91-94.
- Parmacek, M. S. (2007). Myocardin-related transcription factors: critical coactivators regulating cardiovascular development and adaptation. *Circ Res* **100**, 633-644.
- Pencina, M. J., Navar-Boggan, A. M., D'Agostino, R. B., Sr., Williams, K., Neely, B., Sniderman, A. D., and Peterson, E. D. (2014). Application of new cholesterol guidelines to a population-based sample. *New Engl J Med* **370**, 1422-1431.
- Peyre, L., Zucchini-Pascal, N., de Sousa, G., and Rahmani, R. (2012). Effects of endosulfan on hepatoma cell adhesion: Epithelial-mesenchymal transition

- and anoikis resistance. *Toxicology* **300**, 19-30.
- Pierno, S., De Luca, A., Tricarico, D., Roselli, A., Natuzzi, F., Ferrannini, E., Laico, M., and Camerino, D. C. (1995). Potential risk of myopathy by HMG-CoA reductase inhibitors: a comparison of pravastatin and simvastatin effects on membrane electrical properties of rat skeletal muscle fibers. *J Pharmacol Exper Ther* **275**, 1490-1496.
- Pinon, J. D., Labi, V., Egle, A., and Villunger, A. (2008). Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene* **27 Suppl 1**, S41-52.
- Powers, S. K., Smuder, A. J., and Judge, A. R. (2012). Oxidative stress and disuse muscle atrophy: cause or consequence? *Curr Opin Clin Nut Metab Care* **15**, 240-245.
- Rabkin, S. W., and Kong, J. Y. (2003). Lovastatin-induced cardiac toxicity involves both oncotic and apoptotic cell death with the apoptotic component blunted by both caspase-2 and caspase-3 inhibitors. *Toxicol Appl Pharmacol* **193**, 346-355.
- Rodenberg, J. M., Hoggatt, A. M., Chen, M., Touw, K., Jones, R., and Herring, B. P. (2010). Regulation of serum response factor activity and smooth muscle cell apoptosis by chromodomain helicase DNA-binding protein 8. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**, C1058-1067.
- Sabe, A. A., Elmadhun, N. Y., Sadek, A. A., Chu, L. M., Bianchi, C., and Sellke, F. W. (2014). Differential effects of atorvastatin on autophagy in ischemic and nonischemic myocardium in Ossabaw swine with metabolic syndrome. *J Thoracic Cardiovasc Surg* **148**, 3172-3178.
- Sacher, J., Weigl, L., Werner, M., Szegedi, C., and Hohenegger, M. (2005). Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. *J Pharmacol Exper Ther* **314**, 1032-1041.
- Sakamoto, K., Mikami, H., and Kimura, J. (2008). Involvement of organic anion

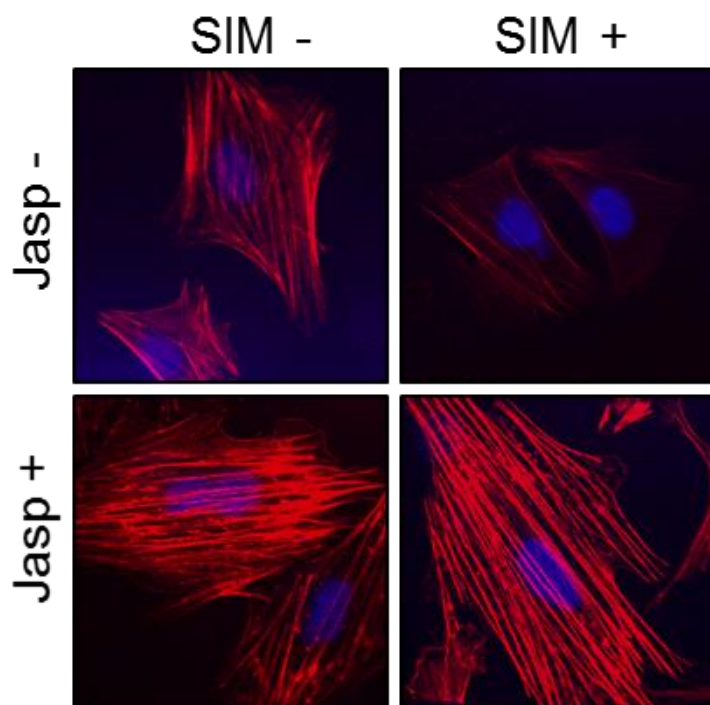
- transporting polypeptides in the toxicity of hydrophilic pravastatin and lipophilic fluvastatin in rat skeletal myofibres. *Br J Pharmacol* **154**, 1482-1490.
- Sakamoto, K., Wada, I., and Kimura, J. (2011). Inhibition of Rab1 GTPase and endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking underlies statin's toxicity in rat skeletal myofibers. *J Pharmacol Exper Ther* **338**, 62-69.
- Shimobayashi, M., and Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 155-162.
- Stringer, H. A., Sohi, G. K., Maguire, J. A., and Cote, H. C. (2013). Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients with statin-induced myopathy. *J Neurol Sci* **325**, 142-147.
- Stroes, E. S., Thompson, P. D., Corsini, A., Vladutiu, G. D., Raal, F. J., Ray, K. K., Roden, M., Stein, E., Tokgozoglu, L., Nordestgaard, B. G., Bruckert, E., De Backer, G., Krauss, R. M., Laufs, U., Santos, R. D., Hegele, R. A., Hovingh, G. K., Leiter, L. A., Mach, F., Marz, W., Newman, C. B., Wiklund, O., Jacobson, T. A., Catapano, A. L., Chapman, M. J., and Ginsberg, H. N. (2015). Statin-associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus Panel Statement on Assessment, Aetiology and Management. *Eur Heart J* **36**, 1012-1022.
- Takemoto, M., and Liao, J. K. (2001). Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 1712-1719.
- Tanaka, S., Sakamoto, K., Yamamoto, M., Mizuno, A., Ono, T., Waguri, S., and Kimura, J. (2010). Mechanism of Statin-Induced Contractile Dysfunction in Rat Cultured Skeletal Myofibers. *J Pharmacol Sci* **114**, 454-463.
- Thompson, P. D., Clarkson, P., and Karas, R. H. (2003). Statin-associated myopathy.

- Jama* **289**, 1681-1690.
- VanBrocklin, M. W., Verhaegen, M., Soengas, M. S., and Holmen, S. L. (2009). Mitogen-activated protein kinase inhibition induces translocation of Bmf to promote apoptosis in melanoma. *Cancer Res* **69**, 1985-1994.
- Wang, C. Y., Liu, P. Y., and Liao, J. K. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* **14**, 37-44.
- Wang, Y., Zhao, G. X., Xu, L. H., Liu, K. P., Pan, H., He, J., Cai, J. Y., Ouyang, D. Y., and He, X. H. (2014). Cucurbitacin IIb exhibits anti-inflammatory activity through modulating multiple cellular behaviors of mouse lymphocytes. *PLoS One* **9**, e89751.
- Wirth, A. (2010). Rho kinase and hypertension. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 1276-1284.
- Woo, H.-H. (2010). Vascular smooth muscle dysfunction induced by simvastatin, hyperlipemia medication. *Master's Thesis*. Seoul National University.
- Zhou, Q., Gensch, C., and Liao, J. K. (2011). Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 167-173.
- Zhou, Y., Huang, X., Hecker, L., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Liu, H., Jin, T. H., Desai, L., Bernard, K., and Thannickal, V. J. (2013). Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **123**, 1096-1108.
- Zhu, S., Nagashima, M., Khan, M. A., Yasuhara, S., Kaneki, M., and Martyn, J. A. (2013). Lack of caspase-3 attenuates immobilization-induced muscle atrophy and loss of tension generation along with mitigation of apoptosis and inflammation. *Muscle Nerve* **47**, 711-721.

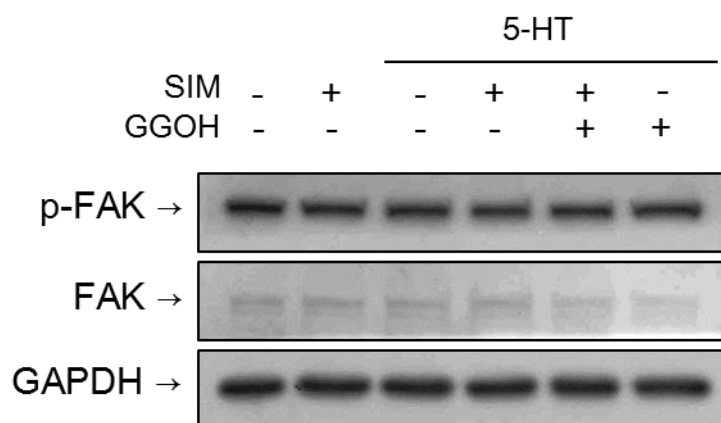
Abstract

Statins, lipid-lowering agents for the prevention of atherosclerosis and fatal coronary heart diseases, have pleiotropic modalities on the function and physiology of vascular smooth muscle that include anti-contractile and pro-apoptotic effects. These effects were suggested to stem from the inhibition of small GTPase Rho A, but they are largely regarded as distinct and unrelated. Recently, simvastatin was reported to cause both contractile dysfunction and apoptosis of vascular smooth muscle cells (VSMCs), reflecting that they may be closely related, yet their connecting link remains unexplained. Here, the mechanism underlying simvastatin-induced apoptosis of normal VSMCs in connection with contractile dysfunction was investigated. In primary cultured VSMCs, simvastatin impaired the activation of small GTPases, RhoA along with Rac-1, which resulted in the disruption of actin integrity, a pivotal factor both for the generation of contractile force and survival of VSMCs. In line with the disruption of actin integrity, Bmf, a pro-apoptotic factor bound to intact actin, dissociated and translocated into mitochondria, which corresponded well with the dissipation of mitochondrial membrane potential, autophagy induction, caspase-3 activation and ultimately apoptosis. These events were all rescued by an actin stabilization agent, jasplakinolide as well as geranylgeraniol, indicating that damages of the actin integrity from disrupted activation of RhoA/Rac-1 lies at the center of simvastatin-induced contractile dysfunction and apoptosis in vascular smooth muscle.

Keywords: Simvastatin, Vascular smooth muscle cell, Actin cytoskeleton, Contractile dysfunction, Autophagy, Apoptosis



Suppl. 1. Reversal of simvastatin-induced disruption of F-actin with F-actin stabilizing agent in VSMCs. Rescue effects of Jasp on F-actin contents were investigated after the co-incubation of SIM 10 μ M and Jasp 50 nM for 4 hr. Merged images were obtained with rhodamine-phalloidin (F-actin; red) and Hoechst 33342 (nucleus; blue) stain.



Suppl. 2. Effects of simvastatin on focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation.

After VSMCs were incubated with SIM μM and GGOH $30 \mu\text{M}$ for 24 hr, 5-HT 10^{-5} M was added for 10 min to stimulate FAK. The level of phosphorylated FAK was not altered by SIM, regardless of agonist stimuli.